

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**EFFETS DU CADMIUM SUR L'EXPRESSION
D'ENZYMES DE BIOTRANSFORMATION
AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION
ENTÉROCYTAIRE**

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

AMANDINE BONET

SEPTEMBRE 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier très sincèrement et à juste titre ma directrice de recherche le Dr Catherine Jumarie de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci pour votre soutien, votre disponibilité et votre gentillesse. Vous avez toujours su trouver le temps et le courage de m'accompagner dans ce travail. Je n'y serais jamais arrivée sans vous ! Tout au long de ce projet, vous m'avez apporté bien plus que votre aide, vos idées et critiques constructives, et je vous suis particulièrement reconnaissante de m'avoir fait confiance ; vous avez su me faire partager vos passions pour la recherche et l'enseignement, vous m'avez beaucoup transmis. Merci pour votre oreille attentive et votre épaule, et surtout merci d'avoir su trouver les bons mots dans les moments difficiles.

J'adresse aussi mes remerciements à Messieurs François Dragon et Sami Haddad qui me font l'honneur d'examiner et juger ce mémoire.

Un énorme merci à mes collègues, grâce à vous, ces années se sont déroulées dans un cadre de travail agréable. Un grand merci à Marc Mantha pour sa grande patience, sa gentillesse et sa grande disponibilité. Tu m'as communiqué beaucoup de ton savoir, de tes connaissances et astuces qui m'ont aidé à avancer tout au long de ce projet. Mes très sincères et amicaux remerciements à Vincent Bellanger pour nos nombreuses manipulations musicales et rythmées, nos repas partagés, pour les litres de café engloutis, les heures passées à rigoler et discuter. Merci également à Véronique, Rachelle et Annie, j'ai toujours apprécié votre compagnie et votre bonne humeur.

J'ai rencontré beaucoup de personnes qui m'ont apportés du réconfort par les discussions, les rires, les barbecues, les parties de pétanque au Parc Lafontaine, les weekends nature et j'en passe. Merci à toute ma petite famille Franco-Québécoise : Eric, Élisabeth, Mon Jérémy, Tom, Max... pour tous ces bons moments partagés et vos encouragements pendant ses deux belles années. Et bien sûr, un merci tout particulier à toi ma Roxounette pour ton implication et pour m'avoir endurée quotidiennement et suivie attentivement tout au long de ce travail, même si par moment je te perdais en cours de route, tu t'es toujours accrochée (à ta brosse à dents) !!! Loin des yeux mais jamais du

cœur, mon Toto, mon Éloïdo, ma Pac, ma Nath..., nous avons eu la preuve que la distance n'altère en rien la qualité de notre amitié qui m'est extrêmement précieuse ! Merci à vous tous pour votre appui constant.

Enfin, MERCI à mes parents et à mon frère qui m'ont toujours soutenue dans mes aventures et qui ont toujours cru en moi. Vous avez toujours été là pour moi, j'ai enfin fini par passer à travers toutes ces années d'études !

Qu'il me soit aussi permis d'associer à ces remerciements toutes les personnes non citées qui, d'une façon ou d'une autre ont participé à mes travaux.

« Un bon scientifique est un détective sur la piste de la nature. »

John Darnton

La conspiration de Darwin

« Science sans conscience n'est que ruine de l'âme »

François Rabelais

Pantagruel

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	xiii
LISTE DES SYMBOLES.....	xvii
RÉSUMÉ.....	xx
INTRODUCTION.....	1
PREMIÈRE PARTIE	
MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET JUSTIFICATION DE LA DÉMARCHE EXPERIMENTALE.....	3
CHAPITRE I	
LA PRÉSENCE DU CADMIUM DANS L'ENVIRONNEMENT.....	4
1.1 Propriétés physico-chimiques du cadmium.....	4
1.2 Les différentes utilisations du cadmium.....	5
1.3 Les principales sources d'émission du cadmium dans l'environnement.....	6
1.4 Le cadmium dans les différents compartiments environnementaux : sources d'exposition.....	7
1.4.1 Le cadmium dans l'eau et les sols.....	7
1.4.2 Le cadmium dans l'air.....	8
1.4.3 Présence du cadmium dans la nourriture.....	9
CHAPITRE II	
DEVENIR DU CADMIUM DANS L'ORGANISME ET SES IMPACTS SUR LA SANTÉ HUMAINE.....	11
2.1 Toxicocinétique du cadmium.....	11
2.1.1 Absorption et spéciation.....	11
2.1.1.1 Absorption par inhalation.....	11
2.1.1.2 Absorption par ingestion.....	12
2.1.2 Transport et distribution du Cd dans l'organisme.....	12
2.1.2.1 Distribution au niveau des reins.....	13
2.1.2.2 Distribution au niveau du foie.....	13
2.1.3 Excrétion.....	15
2.2 Toxicité du cadmium.....	16
2.2.1 Effets toxiques connus.....	16
2.2.1.1 Effets d'une exposition chronique au cadmium.....	17

CHAPITRE III	
PHYSIOLOGIE INTESTINALE.....	18
3.1 Caractéristiques générales du système digestif	18
3.1.1 Anatomie macroscopique de l'intestin grêle.....	19
3.1.2 Anatomie microscopique de l'intestin grêle.....	20
3.1.2.1 La paroi intestinale	20
3.1.2.2 L'épithélium intestinal.....	21
3.2 Différenciation des entérocytes.....	22
3.3 L'entérocyte de l'épithélium intestinal : site d'absorption du Cd.....	24
3.3.1 Rôle majeur de l'entérocyte.....	24
3.3.2 Absorption intestinale du Cd.....	24
3.4 Modèle d'étude <i>in vitro</i>	26
3.4.1 Lignées cellulaires vs. cultures primaires.....	26
3.4.2 Modèle de l'épithélium intestinal reconstitué avec la lignée cellulaire Caco-2.....	26
CHAPITRE IV	
LES ENZYMES DE BIOTRANSFORMATION D'INTÉRÊT.....	30
4.1 La biotransformation : une stratégie importante de défense de l'organisme.....	30
4.1.1 Les réactions majeures de biotransformation.....	31
4.2 Le cytochrome P450 (CYP450).....	33
4.2.1 Généralités.....	33
4.2.2 Iso-enzyme CYP1A1.....	36
4.2.2.1 Généralités.....	36
4.2.2.2 CYP1A, récepteurs AhR et cadmium.....	37
4.2.2.3 CYP1A1 et P-gp.....	39
4.2.3 Iso-enzyme CYP3A4.....	40
4.2.3.1 Généralités.....	40
4.2.3.2 Iso-enzyme CYP3A4 et récepteurs PXR.....	41
4.3 Les glutathion S-transférases (GST).....	42
4.3.1 Généralités.....	42
4.3.2 Isoforme GSTP1 d'intérêt dans la lignée Caco-2.....	43
4.3.3 Isoforme GST- π et cadmium.....	43
4.4 Le transporteur membranaire MDR1 ou glycoprotéine P (P-gp).....	44
4.4.1 Généralités sur la P-gp.....	44

4.4.2	Synergie P-gp/CYP3A4.....	46
4.4.3	P-gp et cadmium.....	47
CHAPITRE V		
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHES.....		49
5.1	Problématique.....	49
5.2	Hypothèses de travail.....	50
5.3	Objectifs de recherches.....	50
CHAPITRE VI		
MATÉRIEL ET MÉTHODE EXPERIMENTALE.....		51
6.1	Culture cellulaire.....	51
6.2	Test de viabilité cellulaire.....	52
6.3	Analyses RT-PCR.....	55
6.4	Exposition chronique au Cd.....	57
6.5	Mesure de l'activité phosphatase alcaline.....	58
6.6	Mesure de l'activité EROD.....	60
6.7	Mesure de l'activité de la GST.....	62
6.8	Evaluation de l'accumulation cellulaire de Cd après deux semaines d'exposition.....	63
6.9	Résistance membranaire des cellules Caco-2.....	64
6.10	Analyses statistiques.....	64
DEUXIÈME PARTIE		
PRÉSENTATION DES RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		65
CHAPITRE VII		
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		66
7.1	Effets du Cd sur la viabilité cellulaire.....	66
7.2	Effets du Cd sur le profil d'expression des gènes associés aux quatre enzymes d'intérêt.....	68
7.2.1	Profils d'expression des gènes d'intérêt selon le temps de culture chez les cellules Caco-2 non-traitées.....	68
7.2.2	Profils d'expression des gènes d'intérêt selon différents types de traitements.....	71
7.3	Vitamine et NAC : un même effet préventif contre le Cd ?	76
7.4	Accumulation cellulaire du Cd.....	77
7.5	Effets du Cd sur l'activité du CYP1A1	79
7.6	Effets du Cd sur l'activité des GST.....	83

7.6.1	Caractérisation de l'activité de la GST des cellules Caco-2 selon le temps de culture.....	83
7.6.2	Effet du Cd sur l'activité de la GST.....	84
7.7	Effets du Cd sur la différenciation cellulaire.....	86
7.7.1	Caractérisation de l'activité de la phosphatase alcaline des cellules Caco-2 selon le temps de culture.....	86
7.7.2	Effets de divers traitements des cellules Caco-2 sur l'activité de la phosphatase alcaline	87
7.7.3	Effet inhibiteur du Cd sur l'activité de la phosphatase alcaline.....	88
7.8	Effet du Cd sur l'étanchéité de la monocouche cellulaire.....	90
	CONCLUSION.....	92
	RÉFÉRENCES.....	94

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Répartition des différents usages du Cd.....	6
1.2	Les différentes sources d'émission environnementale du Cd.....	7
2.1	Schéma résumant le transport et la distribution du Cd dans l'organisme après son absorption.....	14
3.1	Schéma représentatif de l'appareil digestif humain.....	19
3.2	Représentation schématique des 3 niveaux de replis de la paroi intestinale.....	20
3.3	Schéma d'un entérocyte.....	22
3.4	Schéma représentatif de la différenciation des entérocytes.....	23
3.5	Monocouche de cellules Caco-2 après 21 jours de culture (Grossissement: 20X).....	27
3.6	Cellules Caco-2 après 21 jours de culture (Grossissement: 20X).....	28
4.1	Etapes simplifiées du cycle catalytique du CYP450.....	32
6.1	Schéma simplifié résumant le test MTT.....	53
6.2	Schéma résumant les trois protocoles d'exposition au Cd des cellules Caco-2.....	54
7.1	Viabilité de cellules Caco-2 cultivées pendant 8 ou 21 jours et exposées à des concentrations croissantes de Cd selon divers protocoles d'exposition. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle (0 μ M de Cd). Les valeurs sont les moyennes \pm écarts types de 6 passages indépendants.....	67
7.2	Profil d'expression de 3 enzymes de biotransformation et du transporteur membranaire P-gp en fonction du temps de culture des cellules Caco-2. Les cellules ont été cultivées pendant 21 jours en absence de Cd. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 4 à 11 cultures indépendantes.....	68

7.3	Profil d'expression de 2 enzymes de biotransformation et du transporteur membranaire P-gp en fonction du temps de culture des cellules Caco-2. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types des rapports pairés: niveau ARNm J21/ ARNm J7 effectués pour chaque culture et sur 3 à 6 cultures indépendantes. Le niveau d'expression de l'ARNm au jour 7 est arbitrairement fixé à 1. (*) significativement supérieur à 1.....	69
7.4	Profil d'expression des enzymes d'intérêt en fonction du traitement des cellules Caco-2. Les cellules sont cultivées sur boîte de Pétri en absence (non traitées) ou en présence de 36 μ M de Cd ou de 0.5 μ M de vitamine D ₃ seuls ou en combinaison du J8 au J21. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 3 à 9 passages.....	71
7.5	Structure chimique de la vitamine D ₃ (1 α ,25-dihydroxy vitamine D ₃) d'après : "Nomenclature of Vitamin D". Recommendations 1981. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN).....	73
7.6	Schéma résumant la phase oxydative de la voie des pentoses phosphates dans laquelle intervient la G6PDH.....	75
7.7	Profil d'expression de la GSTP1 et de la Pg-p en fonction du traitement des cellules Caco-2. Les cellules sont cultivées sur boîte de Pétri en absence (non traitées) ou en présence de 36 μ M de Cd, de 0.5 μ M de vitamine D ₃ ou de 500 μ M de NAC seuls ou en combinaison du J8 au J21. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 3 à 9 passages.....	77
7.8	Accumulation intracellulaire de Cd selon le type de traitement. Les cellules ont été exposées à 0,5 μ M de ¹⁰⁹ Cd du jour 8 au jour 21. Les résultats représentent les moyennes \pm écarts types obtenues sur 2 à 3 cultures indépendantes (5 réplicas chacune).....	78
7.9	Mesure de l'activité EROD en suivant la dééthylation de l'éthoxyrésorufine en résorufine fluorescente (λ excitation: 563 nm; λ émission: 582 nm) en fonction du temps d'incubation en présence de NADPH ajouté seul au milieu de réaction ou en présence d'un système de régénération de NADP en NADPH à l'aide du système G6P/G6PDH.	79
7.10	Courbes standards de résorufine utilisées pour calibrer l'activité EROD des échantillons cellulaires. Des quantités croissantes connues de résorufine ont été diluées dans du tampon phosphate. Les mesures ont été effectuées à 37°C et à différents temps d'incubation. Les longueurs d'onde (λ) d'excitation et d'émission optimales sont respectivement 563 nm et 582 nm.....	82

7.11	Mesure de l'activité de la GST selon le temps de culture à l'aide du CDNB utilisé comme substrat. La mesure s'effectue sur 4 passages indépendants témoins : P219, P205, P209 et P210 au J7 et au J21 de culture. Elle est réalisée à 340 nm et 25°C pendant 5 min au spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en nmol de CDNB-GSH/mg de protéines cytosoliques.....	84
7.12	Comparaison de l'activité de la GST entre des cellules contrôles et des cellules traitées au Cd du J8 au J21. Les résultats ont été obtenus sur 4 cultures indépendantes au J7 et au J21.....	85
7.13	Cinétique d'activité GST mesurée par conjugaison du CDNB avec le GSH. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de deux cultures indépendantes.....	86
7.14	Mesure de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline selon le temps de cultures dans les cellules Caco-2 contrôles. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 4 à 10 cultures indépendantes. Les résultats aux lettres différentes sont significativement différents les uns des autres (ANOVA).....	87
7.15	Mesure de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline selon le type de traitement des cellules Caco-2 de 14 ou 21 jours de culture. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 4 à 10 cultures indépendantes. Les résultats aux lettres différentes sont significativement différents les uns des autres (ANOVA).....	88
7.16	Activité de la phosphatase alcaline en fonction de concentrations croissantes de Cd ajoutées en cuvette lors du dosage d'échantillons cellulaires contrôles de 21 jours de culture. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 4 cultures indépendantes.....	89
7.17	Mesure de la résistance électrique transépithéliale (RETE) du tapis de cellules Caco-2 selon le temps de culture ($n = 1$). Les cellules ont été cultivées pendant 21 jours sur filtres de 24 mm de diamètre ayant des pores de 0,4 μ m en présence ou en absence (contrôles) de Cd.....	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1	Caractéristiques physico-chimiques du Cd.....5
6.1	Tableau résumant les différentes conditions de traitement pour l'extraction de l'ARN.....58
6.2	Tableau résumant les différents traitements pour la mesure d'activité de la phosphatase alcaline.....59
6.3	Tableau résumant les conditions de traitements des cellules pour la mesure de l'activité EROD.....60
6.4	Tableau résumant les conditions de traitements pour la mesure de l'activité de la GST.....62
6.5	Tableau résumant les trois conditions de traitement au ¹⁰⁹ Cd.....63

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Acétyl Co-A	coenzyme acétylée
ADN	acide désoxyribonucléique
AhR	aryl hydrocarbon receptor
Alb	albumine
AP-1	activator protein-1
ARNm	acide ribonucléique messenger
Arnt	aryl hydrocarbon nuclear translocator
ATP	adénosine triphosphate
β -NF	β -naphthoflavone
BSA	bovine serum albumin
BSO	buthionine-(S,R)-sulfoximine
CDNB	chlorodinitrobenzène ou 1-chloro-2,4-dinitrobenzène
CYP	cytochrome
CYP450	cytochromes P450
CYP1A1	iso-enzyme cytochrome P1A1
CYP3A4	iso-enzyme cytochrome P3A4
Cys	acide aminé cystéine
DMEM	dulbecco's modified eagle essential minimum medium
DMSO	diméthylsulfoxyde
DMT1	divalent metal transporter 1
DR3	direct repeat-3 vitamin D response element
DTT	dithiothréitol ou réactif de Cleland
EDTA	acide éthylènediaminotétraacétique
EROD	ethoxyresorufin-O-deethylase

FBS	fetal bovin serum (Sérum bovin foetal)
γ -GCS	γ -glutamyl cysteine synthetase
Glu	acide aminé glutamine
GLUT1	facilitated glucose transporter 1
Gly	acide aminé glycine
GPx	glutathion peroxydase
G6P	glucose-6-phosphate
G6PDH	glucose-6-phosphate déshydrogénase
GSH	glutathion réduit
GSH-Cd	complexe cadmium-glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
GST	glutathione-S-transferase
GSTA1	glutathione-S-transferase A1
GSTP1	glutathione-S-transferase π 1
HAP	hydrocarbures aromatiques polycycliques
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HSE	heat shock element
MDR1	multiple drug resistance 1
MRP	multiple drug resistance associated protein
MT	métallothionéine
MT-Cd	complexe métallothionéine-cadmium
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromide
NAC	N-acétylcystéine
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite

NADPH-CYP450	complexe formé du NADPH et d'un CYP450
NAD(P)H-Nqo1	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-quinone Oxydoréductase
NR1	nuclear receptor gene family 1
NRAMP2	protéine associée à la résistance naturelle du macrophage 2
PAPs	3-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate
PCR	polymerase chain reaction (ou réaction de polymérisation en chaîne)
P-gp	glycoprotéine P ou transporteur membranaire MDR1
PXR	pregnane X receptor
QOR	quinone oxydoreductase (voir aussi Nqo1)
RETE	résistance électrique transépithéliale
RNase	ribonucléase
ROS	reactive oxygen species
RT	reverse transcriptase
SOD	superoxyde dismutase
SXR	steroid and xenobiotic receptor
UDP	uridine diphosphate
UGT1A6	UDP-dependent glucuronosyltransférase)
VDR	vitamin D receptor
VitD ₃	1 α , 25-dihydroxy vitamine D ₃
VRDEs	vitamin D response elements
XRE	xenobiotic response element

Autres abréviations

DO	densité optique
J0	jour zéro
J1	jour 1
J8	jour 8
J7	jour 7
J14	jour 14
J21	jour 21
(ox)	oxydé
(réd)	réduit
pH	potentiel d'hydrogène
UV	ultraviolet
Ctrl	contrôle

Organismes

ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CBIP	Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique
IARC	International Agency for Research on Cancer
IUB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JCBN	Joint Commission on Biochemical Nomenclature
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
SEME	Surveillance Environnement Marin Estuarien
US-EPA	United States Environmental Protection Agency

LISTE DES SYMBOLES

atm	atmosphère
°C	degrés Celsius
cm	centimètre
cm ²	centimètre carré
[]	concentration
Da	dalton
e-	électron
g	accélération due à la pesanteur (m/s ²)
g	gramme
h	heure
kb	kilobase
kbp	kilo paires de bases
kg	kilogramme
l	litre
M	molaire
m	mètre
m ³	mètre cube
m ²	mètre carré
mm	millimètre
min	minute
mol	mole
ppm	partie par million
%	pourcentage
<	inférieur

>	supérieur
(I)	degré d'oxydation un
(II)	degré d'oxydation deux
I	un
II	deux
UI	unité internationale
α	alpha
β	bêta
γ	gamma
η	nano
μ	micro
ρ	pico

Symboles chimiques

Ca	calcium
Cd	cadmium
Cd^{2+}	ion cadmium (II)
CdCl_2	chlorure de cadmium
CdO :	oxyde de cadmium
$\text{Cd}(\text{OH})_2$:	dihydroxyde de cadmium
CO_2 :	dioxyde de carbone
Co^{2+}	ion cobalt (II)
$-\text{COOH}$	groupement carboxyle
Cu^{2+}	ion cuivre (II)
Fe	fer
Fe^{2+}	ion ferreux (II)

H^+	proton
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène
Mg	magnésium
Mn^{2+}	ion manganèse (II)
$-NH_2$	groupement amine
Ni^{2+}	ion nickel (II)
O_2	dioxygène
O_2^-	anion superoxyde
$-OH$	groupement hydroxyle
Pb^{2+}	ion plomb (II)
PBS	dulbecco's phosphate buffered saline
RH	substrat hydrophobe
ROH	substrat hydrophile hydroxylé
$-SH$	groupement thiol
SO_4^{2-}	ion sulfate (II)
Zn^{2+}	ion zinc (II)
ZnS	sulfure de zinc

RÉSUMÉ

Le cadmium (Cd) est un métal lourd auquel la population en générale est exposée par l'alimentation. L'épithélium intestinal accumule beaucoup de Cd ingéré et représente un organe cible. Etant donné le rôle de cet épithélium dans la biotransformation de xénobiotiques ingérés, l'objectif de notre étude était d'évaluer dans quelle mesure une exposition chronique au Cd peut perturber l'expression des enzymes de biotransformation lors de la différenciation des entérocytes. Comme modèle *in vitro*, nous avons utilisé la lignée cellulaire humaine Caco-2 qui développe spontanément un phénotype entérocytaire. Le Cd étant connu pour troubler certaines voies de signalisation cellulaires, nous avons testé les hypothèses suivantes : 1) ce métal pourrait modifier l'expression (niveaux et/ou profil) des enzymes de biotransformation ; 2) il serait susceptible d'altérer le processus de différenciation. Le profil d'expression d'enzymes de biotransformation (CYP1A1, CYP3A4 et GSTP1) a été caractérisé par RT-PCR en fonction du temps de culture : les niveaux d'ARNm de la GSTP1, de la P-gp et du CYP1A1 augmentent durant la différenciation. Parallèlement, nous avons estimé par mesure d'activité MTT (viabilité cellulaire), la LC5, soit la concentration d'exposition menant à 5% de mortalité. Lorsque les cellules sont exposées durant la phase de prolifération, une période de récupération augmente considérablement la viabilité ($LC5 = 87 \pm 4$ vs. $15.2 \pm 0.7 \mu M$). Une LC5 de $36 \pm 2 \mu M$ est obtenue lorsque les cellules sont traitées pendant la phase de différenciation montrant que la période de sensibilité maximale est pendant la prolifération. Etant donné les profils d'expression obtenus selon le temps de culture des quatre enzymes d'intérêt dans les cellules Caco-2 témoins, nous avons choisi la LC5 de $36 \pm 2 \mu M$ comme concentration d'exposition pendant la phase de différenciation pour tester l'effet du Cd. Une exposition chronique à cette concentration de Cd perturbe le profil d'expression d'enzymes. De plus hauts niveaux d'ARNm de GSTP1 et de la P-gp sont alors observés mais cette induction par le Cd est diminuée en présence de vitamine D₃ ou de NAC, toutes deux antioxydantes. Ainsi, l'effet du Cd sur la GSTP1 et la P-gp serait médié par un déséquilibre redox.

Des mesures d'activités enzymatiques de CYP1A1 et de GSTP1 ont été effectuées afin de corréler l'effet du Cd sur les niveaux d'ARNm aux activités. Une activité extrêmement faible d'environ 0,290 pmol/min/mg de protéines microsomales a été mesurée dans les cellules contrôles et traitées au Cd de 21 jours, soit presque 100 fois moins que ce qui est rapporté dans la littérature, mais plusieurs études ont révélé l'effet inhibiteur du Cd sur l'activité EROD. Deux types de réponses sont observées quant à l'effet du Cd sur l'activité de la GST : (1) une légère stimulation, (2) une faible inhibition. Nous avons également mesuré une diminution de la résistance électrique transépithéliale confirmant ainsi que le Cd affecte l'intégrité de l'épithélium intestinal en augmentant la perméabilité paracellulaire. Par ailleurs, nos récents résultats suggèrent que le Cd diminue l'activité de la phosphatase alcaline, un marqueur de différenciation. Néanmoins, les enzymes de biotransformation n'étaient pas toutes affectées de la même façon, l'effet du Cd sur ces enzymes n'est pas le résultat (indirect) d'une action "non spécifique" sur le processus global de différenciation. Nos résultats montrent que l'exposition intestinale au Cd pourrait avoir des répercussions sur le métabolisme de premier passage des médicaments et autres xénobiotiques absorbés oralement.

Mots clés : cellules Caco-2 ; épithélium intestinal ; cadmium ; entérocyte ; CYP1A1 ; CYP3A4 ; GSTP1

INTRODUCTION

Le Cd est un métal lourd dont la toxicité n'a éveillé l'attention qu'à partir des années cinquante avec l'apparition de la maladie Itai-Itai au Japon, dans la préfecture de Toyama, suite à son déversement dans les cours d'eau des montagnes par les industries minières. Ceci a entraîné une intoxication massive de la population; le Cd s'est accumulé au fond des rivières et dans les eaux de surface qui ont ensuite été utilisées pour irriguer les rizières. Le Cd absorbé dans le riz s'est ensuite accumulé chez les populations qui en consommaient, provoquant l'apparition de la maladie Itai-Itai responsable de fragilité osseuse, notamment chez les personnes âgées et les femmes ménopausées, ainsi que de toux, d'anémie et d'insuffisance rénale (Bourdin, 2009).

Depuis une époque plus récente, le développement des activités industrielles, et notamment des nouvelles utilisations du Cd, ne font qu'aggraver sa diffusion dans l'environnement. La majeure partie du Cd est utilisée dans divers alliages et pour fabriquer des piles, des batteries électriques, des composants électroniques, des stabilisants du plastique, des pigments de peintures ainsi que dans certaines réactions chimiques en métallurgie (Johnson et al., 2003). Il représente un réel problème environnemental étant donné sa présence dans les eaux et l'air et dans certains aliments (choux, épinards, salades, pêches et en quantité moindre dans les céréales) (Sherlock, 1984).

Le Cd représente également un problème de santé humaine étant donné que l'apport quotidien par la nourriture, l'eau et la simple inhalation (tabagisme et exposition en milieu professionnel) expose l'humain à ce métal. Ainsi, l'inhalation et l'ingestion sont les deux voies principales d'entrée du métal dans l'organisme, ce qui implique le transit à travers les épithéliums pulmonaires et intestinaux, ces derniers représentant les premières barrières biologiques devant être franchies par le Cd avant d'entrer dans la circulation sanguine. Cependant, pour la population en général, l'alimentation constitue la source principale de Cd.

Le problème de sa toxicité provient du fait que le Cd est fortement retenu dans l'organisme et s'accumule énormément dans les reins. En effet, sa demi-vie est de l'ordre de 20 à 30 ans chez l'humain en raison de la lenteur de son excrétion par l'organisme (Santé Canada, 1986). Beaucoup d'effets nocifs sur la santé humaine ont été associés à une exposition aiguë ou chronique au Cd comme des effets toxiques sur les reins, les os et les poumons.

Dans notre cas, nous nous intéressons spécifiquement au Cd ingéré et tout particulièrement au fait que celui-ci, une fois accumulé dans les cellules intestinales, connues aussi sous le nom d'entérocytes, pourrait avoir un impact sur leur rôle dans la biotransformation intestinale. Notre étude nous permettra ainsi de comprendre comment le Cd pourrait affecter cette fonction importante.

PREMIÈRE PARTIE

MISE EN CONTEXTE DE L'ÉTUDE ET JUSTIFICATION DE LA DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I

LA PRÉSENCE DU CADMIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

De nombreuses activités anthropiques rejettent divers métaux à caractère toxique qui finissent principalement dans l'eau et les sols, mais peuvent aussi être rejetés dans l'air. Dans ces divers compartiments environnementaux, les paramètres physicochimiques sont très variables et peuvent ainsi perturber la spéciation de ces métaux et leur potentiel toxique.

L'Homme est soumis à une exposition de plus en plus inquiétante à des xénobiotiques et notamment aux métaux lourds ayant un potentiel toxique sur l'environnement et la santé humaine. La toxicité de nombreux métaux est bien connue depuis longtemps, celle du Cd ayant été observée plus tardivement, surtout depuis les années quatre vingt où sa production a connu un essor foudroyant grâce à ses propriétés technologiques intéressantes.

1.1 Propriétés physico-chimiques du cadmium

Le Cd est un métal de transition d'un blanc argenté qui ternit au contact de l'air ; il est ductile et malléable et sa résistance à la corrosion atmosphérique en fait un bon revêtement protecteur pour certains métaux (ferreux). Lorsqu'il entre en ébullition (767°C), il dégage des vapeurs jaunâtres toxiques et dangereuses pour la santé. Il est souvent présent à l'état divalent et possède des propriétés chimiques proches de celles du zinc. Son analogie de structure cristalline avec celle du zinc lui permet de le remplacer isomorphiquement dans presque tous ses minerais et il est couramment présent comme impureté dans le minerai de sulfure de zinc appelé sphalérite (ZnS) (Cotton et Wilkinson, 1972). Plus généralement, on rencontre le Cd sous forme naturelle de sulfure de Cd (CdS) ou greenockite (Environnement Canada, Rapport APCD76-2, 1976 ; Lymburner 1974).

Ces caractéristiques physico-chimiques majeures sont condensées dans le tableau 1.1 ci-dessous.

Tableau 1.1
Caractéristiques physico-chimiques du Cd (Inspiré du rapport ATSDR, 1999)

Symbole chimique	Cd
Série chimique	Métal de transition
Numéro atomique	48
Groupe, période, bloc	12, 5, d
Masse atomique	112,4 g/mol
Masse volumique	8,64 g/cm ⁻³ (20 °C)
Température d'ébullition	767°C
Température de fusion	321°C
Dureté	2
Pression de vapeur	14,8 Pa

1.2 Les différentes utilisations du cadmium

Aucun minerai de Cd n'existe en quantité exploitable, mais on le retrouve généralement à des concentrations relativement élevées dans les minerais de zinc et de plomb. Il est ainsi obtenu comme sous-produit de la métallurgie lors du raffinage du zinc, du plomb et du cuivre (Nordberg et al., 2007). On l'obtient aussi par recyclage des accumulateurs nickel-Cd (Brignon et Malherbe, 2005).

Au début du XX^{ème} siècle, la demande en Cd étant anodine aucune tentative pour le récupérer au cours de l'extraction du zinc n'était faite et il était donc rejeté dans l'environnement. La demande mondiale n'a cessé d'augmenter au cours du siècle dernier, notamment due à son utilisation dans de nombreuses applications industrielles (Nordberg et al., 2007) (Figure 1.1).

Il est très employé en électroplastie dans les alliages ou pour traiter la surface de certains métaux. En effet, il confère des propriétés de résistance à l'oxydation et à la corrosion et assure une bonne conductivité électrique. Il est aussi employé comme

composant d'alliages au cuivre afin d'en augmenter la résistance mécanique et la température de fusion, sans baisser sa conductivité électrique ; il est de ce fait très utilisé pour certaines pièces automobiles telles que les radiateurs. Il entre aussi dans la composition des baguettes de soudage ou de brasage (Santé Canada, 1986). Beaucoup de ses composés sont utilisés comme pigments de couleurs dans les plastiques et dans différentes peintures, mais aussi comme des stabilisants du plastique. La principale utilisation de Cd concerne les piles et les accumulateurs. Dans ce cas, il est utilisé sous forme hydroxydée $\text{Cd}(\text{OH})_2$ et le couple électrochimique nickel-Cd entre dans la composition des piles et des accumulateurs (Nordberg et al., 2007; Brignon et Malherbe, 2005). Il est également utilisé dans le traitement de lampes à vapeur de Cd, dans les cellules photoélectriques, les catalyseurs (CdO) et composants électroniques. Les fongicides pour pelouses de golf, les écrans de protection des réacteurs nucléaires, les luminophores des écrans de télévision, les huiles à moteur contiennent du Cd mais en quantités moindres.

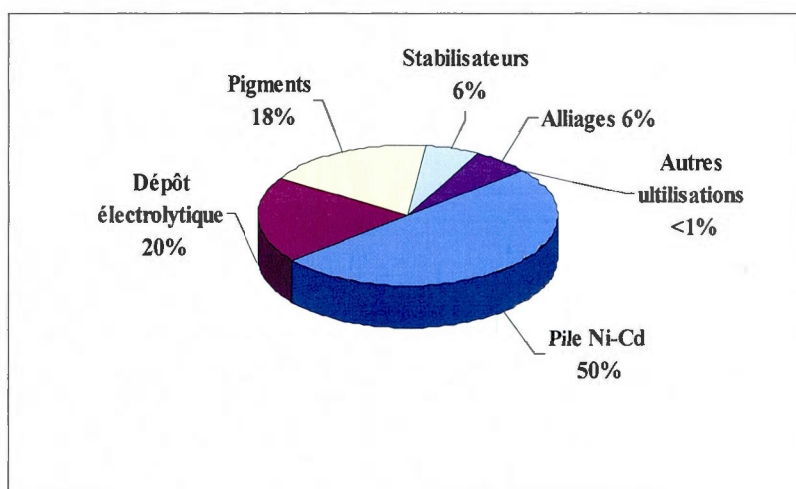


Figure 1.1 Répartition des différents usages du cadmium

1.3 Les principales sources d'émission du cadmium dans l'environnement

Environ 25 000 tonnes de Cd sont libérées par an dans l'environnement. Quelque 8% est d'origine naturelle et provient de l'usure naturelle de la roche, de l'activité volcanique et des incendies de forêts, tandis que les 92% restant proviennent des activités anthropiques (Figure 1.2). En effet, le Cd est rejeté par de nombreux secteurs d'activités

et majoritairement par celui de l'industrie de la sidérurgie et de la métallurgie. Les déchets de ces industries finissent principalement dans l'eau et les sols, mais peuvent aussi être rejetés dans l'air par certaines usines comme celles d'incinération des ordures et de traitements industriels de métaux.

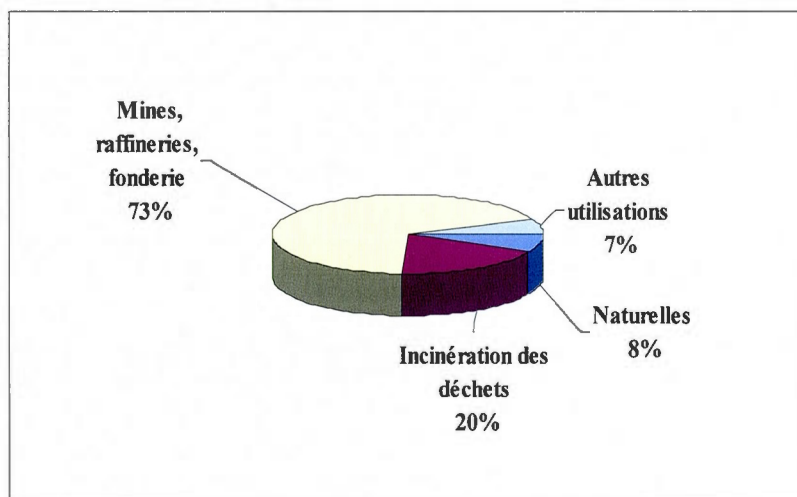


Figure 1.2 Les différentes sources d'émission environnementales du cadmium

1.4 Le cadmium dans les différents compartiments environnementaux : sources d'exposition

Le Cd ne se dégrade pas dans l'environnement, mais des processus physiques et chimiques peuvent modifier sa spéciation, sa mobilité, sa biodisponibilité et son temps de séjour dans différents milieux. Chaque compartiment de l'environnement représente une source d'exposition. L'exposition par contact cutané est très négligeable, voire quasi-nulle (Nordberg et al., 2007) et ne sera pas abordée ici.

1.4.1 Le cadmium dans l'eau et les sols

Le pH du sol influence la mobilité du Cd et l'augmente dans des conditions acides (Eriksson, 1989). Cependant, ayant une grande affinité pour la matière organique, le Cd s'y adsorbe facilement ce qui limite sa mobilité (Blume et Brummer, 1991).

Au niveau des sols, on le rencontre dans les boues des stations d'épuration urbaines et dans les engrais phosphatés (car il y a de faibles quantités de Cd dans les

roches phosphatées) utilisés en agriculture ; le labourage des terrains et la percolation des eaux de pluies contribuent à libérer le Cd dans les hydrosystèmes. De même, les lixiviats des décharges d'ordures ménagères renferment du Cd et l'épandage des boues d'épuration contribuent à accroître la charge polluante des eaux et des sols (Brignon et Malherbe, 2005).

Dans les eaux douces, le potentiel d'oxydoréduction, le pH, la concentration et la composition des matières en suspension sont les principaux facteurs influençant la proportion de Cd dissous et de Cd particulaire tandis que pour les eaux marines, il s'agit essentiellement de la salinité et de la concentration de matières en suspension (Bewers et al., 1987). Dans les eaux naturelles, on retrouve le Cd principalement dans l'eau interstitielle des sédiments et lié à des particules en suspension. Des impuretés de Cd peuvent se détacher des conduits en zinc ou de certaines soudures (joints), mais le Cd peut aussi se dissoudre (dépendamment du pH de l'eau) à partir des tuyauteries et ainsi contaminer l'eau de consommation courante (Santé Canada, 1986). Bien sûr, la plupart des effluents industriels relâchés par les activités métallurgiques et sidérurgiques représentent les sources majeures de pollution des eaux de surface (Brignon et Malherbe, 2005).

1.4.2 Le cadmium dans l'air

Dans l'air ambiant, on retrouve le Cd sous forme de particules ou de vapeurs. Diverses sources rejettent du Cd dans l'atmosphère : l'incinération des ordures ménagères, l'application de produits phytosanitaires et les industries métallurgiques. Le traitement de métaux, notamment du zinc, et le grillage des minerais de cuivre et de nickel, peuvent dégager des vapeurs de Cd jaunâtres et toxiques car sa pression de vapeur est généralement supérieure à celle des métaux traités (Santé Canada, 1986). Les villes très industrialisées, notamment celles ayant des fonderies et des usines d'affinage, possèdent de fortes concentrations atmosphériques de Cd.

«En supposant qu'une personne inhale 20 m³ d'air par jour, le Cd qui y est contenu ne devrait pas contribuer pour plus de 0,0006 mg à l'apport total quotidien aux habitants des régions non urbaines » (Santé Canada, 1986). L'exposition pulmonaire ne

concerne donc pas la population en général mais plutôt les personnes ayant un contact plus direct avec les sources d'émission. En effet, l'environnement professionnel expose d'avantage certains individus, notamment ceux qui travaillent dans les secteurs de la sidérurgie et de la métallurgie ainsi que dans les industries utilisant le Cd et ses composés dans de nombreuses applications. Ces personnes-là peuvent ainsi inhaler des concentrations importantes de Cd se retrouvant dans l'air sous forme de vapeur et/ou de particules (Nordberg et al., 2007).

Le tabagisme représente une importante source de Cd ; en effet, une cigarette contient 1 à 2 µg de Cd dont 10 à 20 % sont inhalés ce qui signifie que la consommation d'un paquet de cigarettes par jour fournit un apport quotidien supplémentaire de 2 à 4 µg. Le tabac, selon sa provenance, sera d'autant plus enrichi en Cd qu'il a été cultivé à proximité de zones industrialisées plus ou moins contaminées. Les fumeurs actifs et passifs inhalent le métal sous forme particulaire (Nordberg et al., 2007). Les fumeurs sont ainsi beaucoup plus exposés et il a été estimé que la charge corporelle totale de Cd et sa concentration dans les reins sont environ deux fois plus élevées chez les grands fumeurs que chez les non-fumeurs (Santé Canada, 1986).

1.4.3 Présence du cadmium dans la nourriture

Le Cd présent dans l'air et l'eau contamine les sols agricoles et finit par entrer dans la chaîne alimentaire. Les teneurs des aliments en Cd dépendent essentiellement des concentrations dans l'air et l'eau, lesquelles dépendent de l'emplacement géographique.

Pour la population en général, la voie principale de pénétration du métal dans l'organisme est l'ingestion. Il a été estimé que l'apport quotidien de Cd par la nourriture, l'eau et l'air pour un adulte Canadien non exposé à ce métal dans son travail, varie de moins de 0,01 à environ 0,05 mg (Santé Canada, 1986). Les aliments représentent la principale source d'exposition au Cd (Park et al., 2002), tandis que la consommation d'eau potable non polluée ne contribue que faiblement à l'apport total de Cd ingéré (moins de 0,01 mg par jour pour un adulte buvant 1,5 L d'eau par jour) (Podrebarac, 1984 ; Santé Canada, 1986). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande

de ne pas dépasser un apport hebdomadaire de 0,4 à 0,5 mg (soit 1µg/Kg de poids corporel par jour).

Certains aliments sont connus pour concentrer ce métal et c'est particulièrement le cas de certains tissus de mollusques et de crustacées tels que ceux des crabes (partie crémeuse) et des huîtres (Friberg et al., 1985) mais aussi les reins et le foie des bovins, moutons et porcs. Certains végétaux verts concentrent bien le Cd. De même, il est présent dans le chou, les épinards, la salade, les pêches et en quantité moindre dans les céréales (Sherlock, 1984). Ceci est souvent dû au dépôt d'aérosols de Cd sur les feuilles et les autres parties aériennes, mais aussi à l'absorption, par les racines, du Cd présent dans le sol.

Ainsi, l'exposition orale augmente avec la consommation d'aliments et d'eau contaminée au Cd. Les populations les plus exposées sont essentiellement celles vivant à proximité des usines rejetant du Cd et consommant des produits contaminés locaux, mais également celles consommant de l'eau contaminées à partir de la dissolution de Cd provenant des tuyauteries.

CHAPITRE II

DEVENIR DU CADMIUM DANS L'ORGANISME ET SES IMPACTS SUR LA SANTÉ HUMAINE

La toxicité du Cd et sa présence dans la chaîne alimentaire font de ce métal un problème de santé humaine étant donné que l'ingestion est la voie majeure d'exposition pour l'ensemble de la population.

2.1 Toxicocinétique du cadmium

2.1.1 Absorption et spéciation

La spéciation du Cd, c'est-à-dire les différentes formes physico-chimiques sous lesquelles il peut se trouver, est d'une grande importance. Elle détermine la mobilité, la biodisponibilité et la toxicité d'un élément chimique. En effet, le taux d'absorption dépend souvent de la spéciation. Il faut donc en tenir compte pour évaluer les risques sur la santé humaine. Sous forme élémentaire, le Cd n'est pas toxique, mais il le devient une fois qu'il se trouve sous sa forme cationique Cd^{2+} qui est électrophile. Il peut être absorbé sous cette forme au niveau intestinal et pulmonaire. Ainsi, il entre en compétition avec d'autres métaux divalents essentiels (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ...) par mimétisme au niveau de certains transporteurs membranaires, mais peut être également absorbé sous formes autres que Cd^{2+} (Jumarie et al., 2001).

2.1.1.1 Absorption par inhalation

Le Cd et ses sels sont peu volatils et sont essentiellement présents dans l'air sous forme d'aérosols riches en particules fines de matière. Le dépôt pulmonaire et la biodisponibilité de ces poussières vont dépendre de leur taille. On estime que la

biodisponibilité pulmonaire du Cd inhalé et de l'ordre de 25 à 50%, mais que cette proportion varie selon la solubilité des composés du Cd et la taille des particules (Rapport ToxProbe Inc. for Toronto Public Health, 1994). L'absorption du Cd sera d'autant plus importante que celui-ci se trouve sous forme de vapeur et/ou de particules fines. Environ 10 à 50 % des particules inhalées sont déposées au niveau des alvéoles pulmonaires et la majeure partie restante, au niveau de la muqueuse trachéo-bronchiale ciliée. Après avoir pénétré dans les voies respiratoires, une partie du métal est repoussée par action mucociliaire vers l'œsophage au niveau duquel il peut être également absorbé, cette fois par voie orale. Aussi, l'absorption du Cd par inhalation de fumée de cigarette, riche en particules de Cd finement dispersées, est très importante (Nordberg et al., 2007; Rapport ToxProbe Inc. for Toronto Public Health, 1994).

2.1.1.2 Absorption par ingestion

Au niveau gastro-intestinale, on considère que seul 4 à 7% du Cd présent dans les aliments ingérés est absorbé (Kitamura et al., 1970; Rahola et al., 1971). La biodisponibilité orale serait environ de 5 % chez les hommes. Chez les femmes d'âge fertile, elle peut augmenter jusqu'à 10 % car il est très courant qu'elles aient un déficit en fer ce qui augmente le niveau d'expression des transporteurs de fer. Ainsi, par compétition avec le fer (section 3.3.1), le Cd est aussi plus absorbé.

2.1.2 Transport et distribution du Cd dans l'organisme

Après avoir été absorbé au niveau des épithéliums pulmonaires et intestinaux, le Cd se retrouve dans la circulation sanguine lié à une fraction de haut poids moléculaire (correspondant à l'albumine) et à une fraction de faible poids moléculaire (Nordberg et al., 1971 ; Nordberg et al., 2007). Cette dernière fraction correspond à la métallothionéine (MT) possédant un poids moléculaire de 6000-7000 g/mol, composée de 60 à 70 acides aminés et très riche en cystéine (30%). La MT fixe les métaux, dont le cation métallique Cd^{2+} , par l'intermédiaire des groupements thiols (-SH) de ses nombreuses cystéines. Dans ce cas, il y a formation du complexe MT-Cd. Sous forme complexée, le Cd ne peut exercer son effet toxique et ainsi l'organisme est protégé. La MT libre est appelée thionéine. La synthèse de la MT sanguine et tissulaire est induite par la présence de

certaines métaux dont le Cd (Nordberg et al., 2007). Ainsi, le Cd circulant se retrouve complexé à la MT.

Le Cd sanguin est distribué aux autres parties de l'organisme. Le Cd se retrouve essentiellement dans le cortex du rein et dans le foie (Figure 2.1); en effet, chez les humains faiblement exposés, environ 50 % de la charge corporelle est retrouvée dans le cortex des reins, 15 % dans le foie et 20 % dans les muscles (Nordberg et al., 2007), mais la thyroïde, le pancréas, les testicules et la vésicule biliaire peuvent également en contenir en concentrations assez élevées. Des études ont montré que l'accumulation de Cd dans le corps humain augmente avec l'âge (Schroeder et Balassa, 1961 ; Piscator et Lind, 1972) et qu'au cours des années, il s'accumule jusqu'à atteindre une concentration maximale vers l'âge de 50 ans (Santé Canada, 1986). Ces pourcentages de répartition varient selon l'âge, l'exposition quotidienne, mais aussi le tabagisme.

2.1.2.1 Distribution au niveau des reins

Le transport du Cd au rein dépend de la formation du complexe MT-Cd. Le transport de MT-Cd sanguin aux cellules tubulaires rénales est rapide et permet son incorporation dans les reins. Ce complexe est de faible taille et peut ainsi être filtré à travers la membrane glomérulaire pour ensuite être réabsorbé par les cellules du tubule proximal. A l'intérieur de ces cellules tubulaires, le complexe est dégradé par les lysosomes ce qui libère le Cd sous sa forme cationique qui s'y accumule et cause des lésions provoquant un dysfonctionnement rénal, tandis que le Cd filtré non lié à la MT n'est pas si bien réabsorbé (Nordberg et al., 2007). Ainsi, suite à une exposition chronique, le Cd présent dans le plasma est complexé à la MT en grande proportion et va atteindre les reins au niveau desquels il sera principalement accumulé, ces derniers peuvent ainsi être considérés comme « l'organe cible ».

2.1.2.2 Distribution au niveau du foie

Une autre partie de Cd est quant à elle liée à l'albumine ainsi qu'à d'autres protéines du plasma sanguin qui sont trop grosses pour être filtrées au niveau du glomérule. Le Cd lié à l'albumine est incorporé dans le foie, puis décomplexé pouvant

ainsi avoir un effet toxique sur les hépatocytes. Le Cd peut également induire la synthèse de MT dans les cellules du foie et entraîner une augmentation progressive de la proportion de complexe MT-Cd (Nordberg et al., 2007). Ainsi les complexes MT-Cd formés dans le foie vont être relargués dans le sang et pouvoir atteindre les glomérules des reins et y être filtrés. De plus, le foie reçoit par l'intermédiaire de la veine porte un grand nombre de molécules issues de la digestion et, de ce fait, joue un rôle important dans l'accumulation du Cd (Forest, cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-902-m.f/bio902).

Selon le type d'exposition, la distribution du Cd dans le corps va différer. Suite à une exposition aiguë, il y a une distribution transitoire du Cd au foie. En fait, le Cd est initialement distribué au foie en plus grande proportion puis redistribué progressivement aux autres organes (notamment les reins) sur de plus longues périodes de temps. Suite à une exposition chronique le Cd est distribué de façon plus importante aux reins qu'au foie.

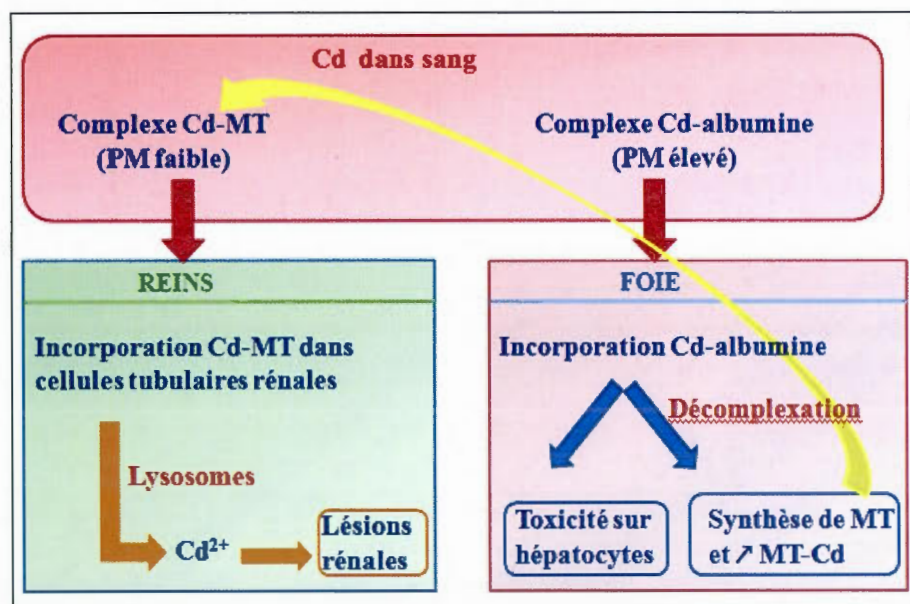


Figure 2.1 Schéma résumant le transport et la distribution du Cd dans l'organisme après son absorption

2.1.3 Excrétion

Le processus d'excrétion est faible mais important d'un point de vue toxicité et son ralentissement entraîne un risque d'accumulation accrue du Cd pouvant mener à des effets toxiques. Une faible proportion de Cd absorbé est excrétée principalement par l'urine et les fèces (0,01- 0,02 % de la charge corporelle totale de Cd quotidienne), tandis qu'il n'est pratiquement pas éliminé par la sueur, les ongles ni les cheveux. L'excrétion du Cd par l'urine augmenterait avec l'âge (comme son accumulation dans l'organisme), et proportionnellement à la charge corporelle totale (Nordberg et al., 2007) . Un adulte en bonne santé excréterait environ 0,002 mg de Cd par jour (Friberg et al., 1974) tandis que chez les individus exposés dans leur travail, on a relevé des concentrations dans l'urine quelques centaines de fois plus élevées. La concentration urinaire est alors un bon indicateur du taux de contamination. Le taux d'excrétion fécale ne serait pas relié à l'âge mais serait également partiellement proportionnel à la charge corporelle de Cd. 90 à 95% du Cd ingéré par l'alimentation n'est pas absorbé et se retrouve directement dans les fèces. Ainsi, le contenu des fèces en Cd représente un bon indicateur de la consommation quotidienne par voie alimentaire.

Aussi, une faible proportion de Cd originaire de la bile du foie et du suc pancréatique se retrouve excrétée dans les fèces sous forme complexée au glutathion réduit (GSH) (tripeptide d'acide glutamique, de cystéine et de glycine qui complexe le Cd grâce au groupement thiol (-SH) de la cystéine). La sécrétion biliaire permet d'éliminer les molécules non excrétées par le rein mais elle peut être contrebalancée par un cycle entéro-hépatique. En effet, la bile contenant le GSH-Cd est déversée dans le duodénum par l'ampoule de Vater (Braunwald et al., 2001) (voir détails en 3.1). Ce conjugué peut subir une hydrolyse et redonner naissance au Cd libre qui est alors à nouveau réabsorbé au niveau du duodénum et transporté au foie par la veine porte-hépatique. A ce niveau là, le foie déverse la bile contenant les nouveaux complexes GSH-Cd dans la lumière duodénale ce qui reproduit le cycle entéro-hépatique. Ce dernier peut être la cause d'un effet toxique prolongé du Cd qui est ainsi éliminé plus lentement, ce augmente d'autant plus sa demi-vie.

La faible et lente excrétion du Cd est due à sa grande rétention par l'organisme. En effet, sa demi-vie biologique a été évaluée pour le foie, les muscles et les reins et varie de 10 à 30 ans soit 15 à 40 % de la durée de vie de l'humain (Friberg et al., 1974). En raison de sa longue demi-vie biologique et de sa réabsorption au niveau des tubules proximaux, le Cd s'accumule dans les reins durant la majeure partie de la vie humaine.

2.2 Toxicité du cadmium

Le Cd pose un vrai problème de toxicité du fait que ce ne soit pas un élément indispensable à l'organisme mais qu'il soit électrophile, qu'une fois absorbé, il ne subisse aucune dégradation métabolique et que par sa forte rétention dans l'organisme il soit très faiblement éliminé résultant en une longue demi-vie biologique chez l'humain (Carrière et al, 2001).

2.2.1 Effets toxiques connus

L'OMS classe le Cd parmi les cancérigènes de type I (cancers démontrés chez l'humain) et beaucoup d'effets nocifs sur la santé humaine ont été associés à une exposition aiguë ou chronique au Cd. Les organes cibles sont souvent les organes d'absorption (épithéliums intestinal et pulmonaire) mais indépendamment de la voie d'absorption, des effets toxiques sur les reins, le foie, les os et les poumons sont connus et le Cd pourrait exercer un puissant effet œstrogénique *in vivo*, imitant ainsi l'action d'hormones féminines (Johnson et al., 2003).

Dans notre étude nous nous intéressons aux effets d'une exposition chronique au Cd car, de façon pragmatique, c'est à ce type d'exposition que la population en général est soumise par l'alimentation contaminée et risque d'être affectée par la toxicité du Cd. Nous ne traiterons donc pas ici de toxicité aiguë.

2.2.1.1 Effets d'une exposition chronique au cadmium

Des effets toxiques sur les reins, les os et les poumons sont les plus reconnus. Au niveau des reins, on peut constater des problèmes d'insuffisance rénale, des lésions rénales et tubulaires ainsi que de nombreux troubles rénaux tels que la protéinurie (excès de protéine dans l'urine), l'amino-acidurie (présence importante d'acides aminés libres dans les urines) et la glycosurie (présence anormale de glucose dans les urines). Il a été montré que des travailleurs exposés au Cd possèdent un faible taux de filtration glomérulaire (Bernard et al., 1992) et que les dommages peuvent être irréversibles (Järup, 2002). Au niveau osseux, le Cd perturbe le métabolisme du Ca entraînant une fragilité osseuse pouvant conduire à l'ostéomalacie (ramollissement des os) ou à l'ostéoporose (faible masse osseuse et détérioration du tissu osseux) (Buchet et al., 1990). Le Cd peut causer des problèmes pulmonaires graves tels que des œdèmes et des emphysèmes, des bronchites chroniques et même des cancers du poumon. Des troubles gastro-intestinaux tels que des diarrhées, des nausées, des vomissements et des crampes intestinales ont été observés. Cependant, l'absorption de Cd est surtout associée à l'apparition de maladies comme la maladie d'Itaï-Itaï observée tout d'abord au Japon et dont les symptômes sont l'ostéomalacie, des fractures osseuses accompagnées de déformations du squelette, ainsi que des douleurs lombaires et des myalgies (douleurs musculaires). Cette maladie s'accompagne aussi de symptômes rénaux typiques de ce type d'intoxication par ingestion tels que la protéinurie, l'amino-acidurie et la glycosurie (Santé Canada, 1986). Enfin, comme mentionné dans la section 2.1.2.2, le Cd lié à l'albumine dans le sang est décomplexé dans le foie et devient hépatotoxique. Les organes d'absorption, dont l'épithélium intestinal, représentent aussi des organes cibles.

CHAPITRE III

PHYSIOLOGIE INTESTINALE

Dans nos travaux de recherche, nous nous intéressons aux effets du Cd accumulé dans l'intestin grêle qui est le site principal d'absorption du Cd pour la majorité de la population mais aussi un premier organe cible du Cd ingéré.

3.1 Caractéristiques générales du système digestif

Le système digestif transforme la nourriture en molécules de nutriments pour les rendre assimilables et ainsi permettre leur absorption dans la circulation sanguine alors que les composés non digestibles ne sont pas absorbés. Il effectue une sorte de « tri », et sa bonne santé est indispensable au maintien de la vie du fait qu'il transforme les aliments en matière première nécessaire à l'approvisionnement des cellules en énergie, mais aussi en éléments structuraux, tels les acides aminés essentiels et les lipides (Marieb, 2005). Les organes qui le composent sont divisés en deux groupes et fonctionnent de façon associée dans la tâche collective de la digestion. Tout d'abord on distingue le groupe des organes du tube digestif (aussi appelé canal alimentaire, de la bouche à l'anus) qui dégradent les aliments en nutriment qui, après avoir franchi la muqueuse du tube digestif, rejoignent la circulation sanguine. Le groupe des organes annexes englobe les dents, la langue, le foie, le pancréas et toutes les glandes digestives. Le foie produit la bile (émulsifie les graisses en fines particules pour faciliter leur digestion par les enzymes du pancréas) déversée dans le duodénum. La vésicule biliaire emmagasine et concentre la bile, puis l'éjecte ensuite dans le conduit cystique qui mène au conduit cholédoque. Le pancréas produit un éventail d'enzymes formant le suc pancréatique qu'il éjecte dans le canal de Wirsung fusionnant plus loin avec le conduit cholédoque juste avant de déboucher dans le duodénum à la hauteur de l'ampoule hépato-pancréatique ou ampoule de Vater (Braunwald et al., 2001) (Figure 3.1). Chaque étape du processus digestif rend les nutriments disponibles à l'organisme grâce à cinq activités majeures : l'ingestion et la

propulsion de la nourriture dans le tube digestif, la digestion mécanique et la digestion chimique (enzymatique), enfin l'absorption (transfert des produits issus de la digestion à travers la muqueuse intestinale vers le sang) (Marieb, 2005).

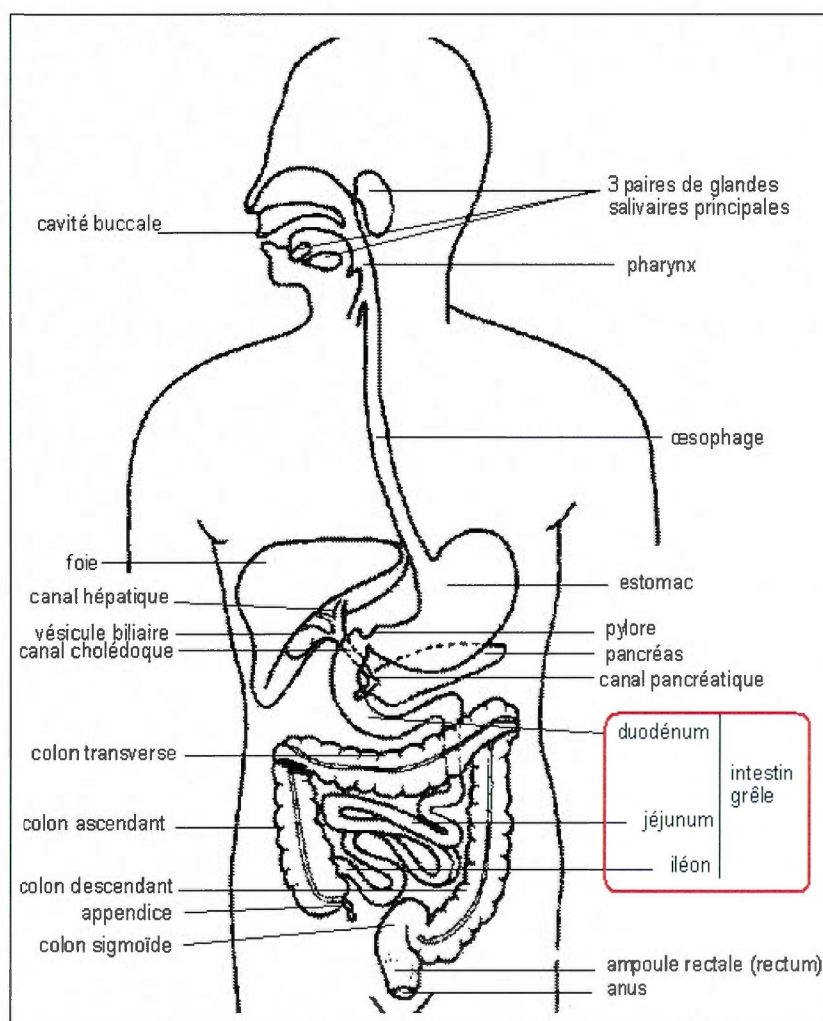


Figure 3.1 Schéma représentatif de l'appareil digestif humain (Tiré du site personnel pédagogique de Pierre Stouff, Sciences de la vie et de la Terre (2002) : <http://pst.chez-alice.fr/svtiufm/mange.htm>)

3.1.1 Anatomie macroscopique de l'intestin grêle

L'intestin grêle se présente sous la forme d'un tube ansé de 6 à 7 m de réelle longueur mais ramenée à environ 2 m par le tonus musculaire. Il débute au niveau du sphincter pylorique qui est un muscle se trouvant à l'extrémité inférieure terminale de

l'estomac et qui agit comme un robinet et régite le déversement de petites quantités de chyme (résultant de la transformation du bol alimentaire dans l'estomac) dans le duodénum (Marieb, 2005). Les différentes parties anatomiques du grêle sont le duodénum (25 cm de long), le jéjunum (2,5 m de long) et l'iléon (3,5 m de long) qui débouche dans sa continuité sur le gros intestin (Catala et al., 2007-2008) (Figure 3.1). Nous nous intéressons davantage au duodénum, car c'est la portion de l'intestin grêle où l'absorption est la plus intense. L'intestin grêle possède de nombreuses enzymes digestives et divers mécanismes de transports spécifiques responsables de l'absorption des nutriments.

3.1.2 Anatomie microscopique de l'intestin grêle

3.1.2.1 La paroi intestinale

La paroi du tube digestif est constituée de quatre couches (ou tuniques) tissulaires ayant chacune un rôle spécifique dans la digestion. De la lumière (cavité) du tube digestif vers l'intérieur, on trouve : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. La surface d'absorption de l'intestin grêle est considérablement agrandie grâce à un dispositif d'amplification comportant trois séries de replis qui multiplient à peu près par 600 la surface de l'intestin grêle qui s'étend sur 200 m² (Figure 3.2).

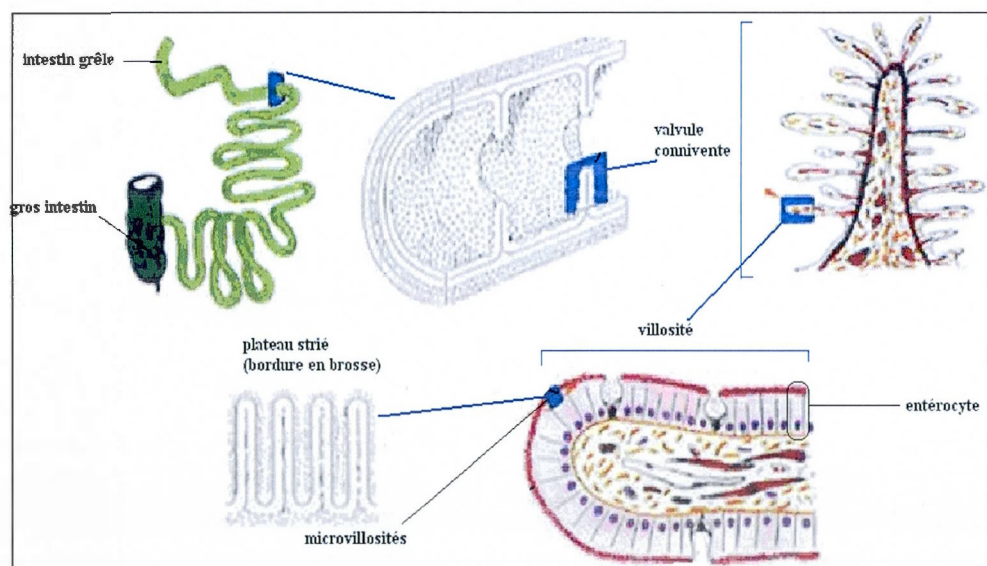


Figure 3.2 Représentation schématique des 3 niveaux de replis de la paroi intestinale (Tiré de "*AnaPhysioBio*" Editions Maloine, p 20-21)

Tout d'abord, on distingue les valvules conniventes représentées par des replis circulaires profonds et permanents des muqueuses et sous-muqueuse. Le déplacement du chyme dans la lumière de l'intestin grêle s'en retrouve ainsi ralenti, favorisant une absorption complète des nutriments. Cette structure multiplie environ par trois la surface. Ensuite, on observe les villosités formant des replis de la muqueuse d'1 mm de hauteur environ mais plus gros dans le duodénum. A l'intérieur de chacune d'elles, se trouve un réseau capillaire et un réseau lymphatique modifié appelé vaisseau chylifère (capillaire lymphatique en cul de sac) ainsi que le chorion et une bande de muscle lisse dont les pulsations rendent l'absorption plus efficace et qui conduisent la lymphe dans le vaisseau chylifère. Les villosités sont tapissées par l'épithélium simple de revêtement intestinal essentiellement constitué de cellules cylindriques absorbantes : les entérocytes. Cette structure augmente la surface par dix environ. Ces cellules absorbantes sont pourvues, à leur pôle apical tourné vers la lumière intestinale, de nombreuses microvillosités qui sont de minuscules replis de la membrane plasmique, supportés par un réseau de microfilaments d'actine, d'environ 0.1 μm de diamètre et 1 à 2 μm de hauteur, et qui forment la « bordure en brosse ». Cette structure, recouverte d'un revêtement riche en glucides et glycoprotéines formant une sorte de feutrage appelé glycocalyx, augmente la surface d'un facteur vingt.

3.1.2.2 *L'épithélium intestinal*

L'épithélium intestinal est prismatique et formé par une seule couche de cellules, d'une épaisseur allant de 40 à 70 μm , qui protège et absorbe. On y retrouve en grande partie les entérocytes, liés entre eux par des jonctions serrées situées au bord de leur surface apicale (voir Figure 3.3) mais aussi de façon moindre et dispersée, deux autres types cellulaires: les cellules caliciformes (sécrétrices de mucus dans la lumière intestinale) et les cellules endocrines (libérant des hormones dans le sang).

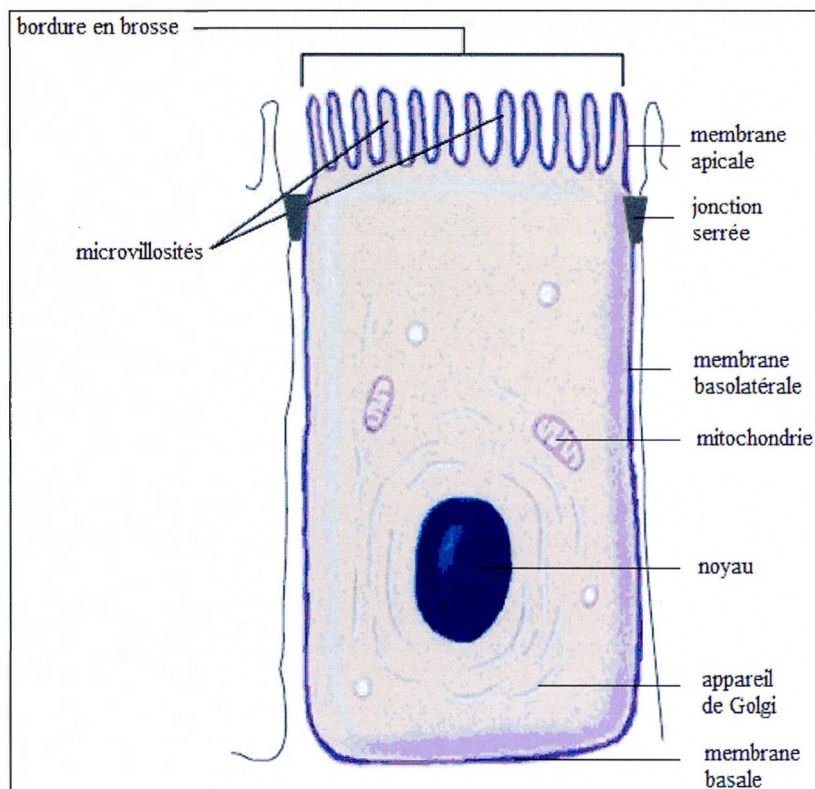


Figure 3.3 Schéma d'un entérocyte (d'après Lorrot et al., 2006)

Les molécules de nutriments ont deux façons de traverser l'épithélium pour rejoindre la circulation sanguine : par passage para-cellulaire, c'est-à-dire en passant entre les entérocytes, ou passage transcellulaire à travers les entérocytes. Dans le premier cas, les molécules ne doivent pas être trop grosses pour pouvoir franchir les jonctions serrées. Dans le passage transcellulaire, deux membranes sont à traverser : c'est le cas du Cd pour lequel la voie paracellulaire est négligeable lorsque les jonctions serrées sont viables, ce qui augmente la charge épithéliale en Cd (Jumarie et al., 1999).

3.2 Différenciation des entérocytes

L'épithélium intestinal fait partie de la muqueuse de la paroi intestinale et se renouvelle très rapidement (tous les 3 à 6 jours). Les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules endocrines naissent de cellules souches situées à la base des cryptes de Lieberkühn, puis prolifèrent à partir de celle-ci par mitoses, remontant peu à peu le long de la crypte tandis que la différenciation cellulaire se fait progressivement au cours de

cette ascension (Figure 3.4). Elles migrent le long de l'axe crypte-villosité tout en devenant matures jusqu'à atteindre le sommet des villosités au niveau duquel elles seront éliminées par anoïkose et remplacées par de nouvelles cellules remontant l'axe des cryptes (Eastwood, 1977 ; Smith, 1985).

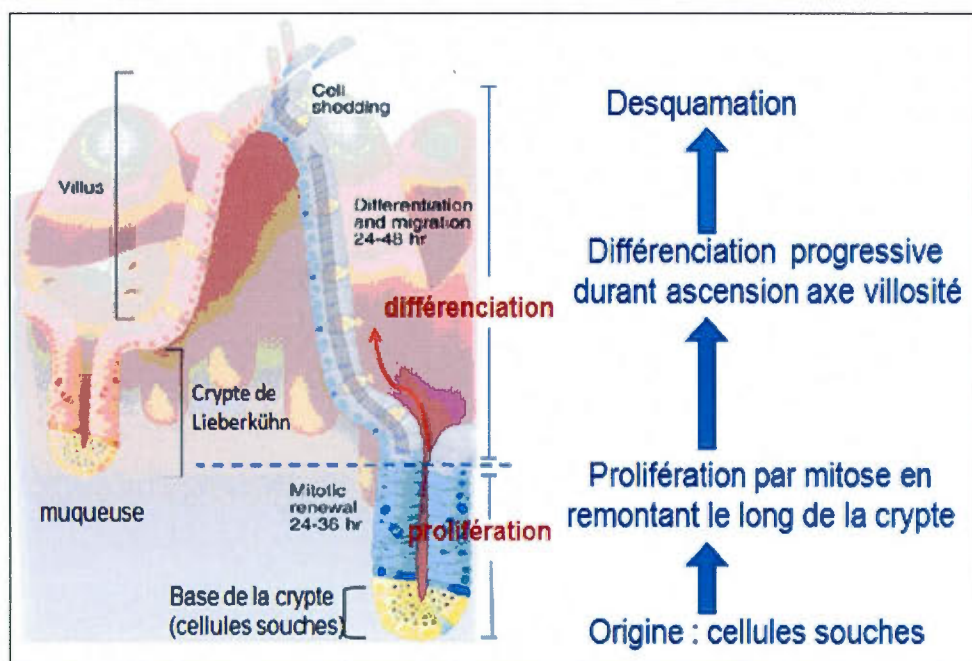


Figure 3.4 Schéma représentatif de la différenciation des entérocytes (Tiré de F.Radtke et al. Science 307, p 1904-1909)

Arrivé à la villosité, l'entérocyte a acquis les caractéristiques morphologiques et structurales d'une cellule absorbante avec l'apparition d'une bordure en brosse apicale et d'une structure polarisée (un pôle apical et un pôle basal). Mais l'entérocyte mature a également acquis de nouvelles caractéristiques fonctionnelles dont les enzymes digestives utilisées comme marqueurs de différenciation. Du côté apical sont exprimées : la lactase, la sucrase-isomaltase, pour la digestion des glucides, des aminopeptidases, des dipeptidases et des carboxypeptidases pour la digestion des polypeptides. Egalement au cours de la différenciation sont exprimées des protéines de transport nécessaires à l'absorption comme les transporteurs d'hexose (SGLT-1) (Blais et al., 1987) et de Fe (NRAMP2) (Canonne-Hergaux et al., 1999 ; Tallkvist et al., 2000 ; Bergeron et Jumarie, 2006).

3.3 L'entérocyte de l'épithélium intestinal : site d'absorption du Cd

3.3.1 Rôle majeur de l'entérocyte

Les entérocytes ont pour rôle de permettre le transit sélectif des nutriments de la lumière de l'intestin grêle vers le sang. Les très nombreuses enzymes hydrolytiques synthétisées au cours de la différenciation entérocytaire sont exprimées dans les microvillosités elles-mêmes. Ces diverses enzymes effectuent les dernières étapes de l'hydrolyse du chyme et livrent ainsi aux « transporteurs » de la membrane plasmique les molécules qu'ils ont pour rôle de faire pénétrer à l'intérieur des entérocytes. Il existe aussi d'autres systèmes de transport qui sont exprimés du côté basal afin de faciliter le transport des molécules de l'intérieur de la cellule vers la circulation sanguine.

3.3.2 Absorption intestinale du Cd

Le passage des métaux au travers des membranes plasmiques peut se faire par des transporteurs ou par diffusion passive selon un gradient de concentration. Le Cd, comme de nombreux métaux lourds, dispose d'une grande affinité pour tout ligand qui est en mesure de partager ou de donner un ou plusieurs électrons, ainsi il est peu probable que le Cd se trouve sous forme ionique dans les systèmes biologiques. L'absorption du Cd va être influencée par sa spéciation dans la nourriture.

L'absorption intestinale du Cd présent dans les nutriments s'effectue au niveau du duodénum. Récemment, il a été montré que la protéine DMT1 (« Divalent Metal Transporter 1 ») (ou DCT1, l'homologue murin de NRAMP2), est ubiquiste chez les mammifères et fortement exprimée dans le duodénum (Park et al., 2002 ; Gunshin et al., 1997). Elle est localisée au niveau de la bordure en brosse des entérocytes de l'intestin grêle, transporte le fer ainsi que d'autres ions divalents dont le Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} et le Pb^{2+} . Elisma et Jumarie (2001) ont également démontré que NRAMP2 transporte aussi le Cd^{2+} , possiblement par mimétisme ionique, avec une inhibition compétitive par le Fe^{2+} .

Le Cd^{2+} peut donc emprunter NRAMP2 alors que d'autres formes de Cd seraient transportées par des systèmes encore à identifier. Une fois dans l'entérocyte, le Cd peut être stocké ainsi et être éliminé dans les fèces lors du renouvellement de l'épithélium ou traverser la membrane basolatérale et entrer dans les capillaires sanguins. La traversée de la membrane cytoplasmique de la cellule intestinale et de la cellule endothéliale fait appel à des transporteurs transmembranaires qui vont varier selon la spéciation. Il existe plusieurs transporteurs d'efflux et d'influx aux membranes apicales et basolatérales (Sherlock, 1984).

L'absorption du Cd est influencée par la forme sous laquelle il se trouve dans la nourriture mais également par le statut en fer (Flanagan et al., 1978 ; Ohta H., Cherian, 1991, 1995). Il a été montré que les femmes d'âge fertile fréquemment reconnues pour présenter des carences en fer dues à de faibles teneurs en ferritine dans leur sérum ($< 20 \mu\text{g/L}$), absorbent quatre fois plus de Cd (Nordberg et al., 2007; Flanagan et al., 1978). L'absorption augmenterait lorsque la réserve de fer est faible (Flanagan et al., 1978 ; Schümann et al., 1996). En effet, le transporteur NRAMP2 est soumis à une régulation post-transcriptionnelle qui dépend des stocks de fer intracellulaire (Université Médicale Virtuelle Francophone, 2008-2009) et il est surexprimé en cas de carence. La compétition entre le Fe^{2+} et le Cd^{2+} au niveau de NRAMP2 explique l'étroite corrélation entre les niveaux d'expression et le taux d'absorption du Cd (Park et al., 2002 ; Nordberg et al., 2007; Tallkvist et al., 2001). En cas de carence en fer, l'absence de compétition favorise donc l'absorption gastro-intestinale de Cd (Zalups et Ahmad, 2003). Ceci est d'autant plus important que la carence en Fe surexprime NRAMP2.

Enfin, il semblerait que les entérocytes puissent être soumis à une double exposition au Cd : une exposition apicale et une exposition basolatérale étant donné la longue demi-vie du Cd. L'entérocyte accumule plus de Cd du côté basolatéral que du côté apical à même concentration d'exposition. Les systèmes de transport basolatéraux sont donc plus efficaces que les systèmes de transport apicaux. Un rôle possible de l'épithélium intestinal comme organe d'excrétion du Cd a été suggéré (Jumarie et al., 1999 ; Carrière et al., 2001).

3.4 Modèle d'étude *in vitro*

3.4.1 Lignées cellulaires vs. cultures primaires

Les lignées cellulaires et les cultures primaires sont souvent utilisées pour effectuer des études *in vitro*. Certes, les cultures primaires sont constituées de cellules non transformées mais elles ne se maintiennent pas en culture et proviennent directement de tissus d'animaux sacrifiés. L'usage de lignées cellulaires est alors plus aisé : leur coût est moins élevé et elles permettent d'étudier des tissus humains tout en évitant d'effectuer des vivisections fréquentes pouvant augmenter les risques de détériorations des cellules lors de leur prélèvement, ce qui en fait un outil de choix pour certaines applications. Toutefois, leur désavantage est de posséder des caractéristiques de cellules cancéreuses, ce qui limite l'interprétation possible des résultats obtenus avec ces lignées. En outre, certaines lignées cellulaires ne sont pas parfaitement homogènes (d'où la création de clones) et possèdent la plupart du temps un phénotype instable à cause de leur origine cancéreuse. Il s'agit en général de cellules cancéreuses prélevées chez un patient ou immortalisée artificiellement, le plus souvent à l'aide de l'antigène viral SV40.

Ainsi, le modèle cellulaire doit suivre certains critères comme d'être représentatif du type cellulaire étudié et son utilisation doit, quant à elle, prendre en compte un nombre de repiquages cellulaires relativement restreint dans le cas de phénotype instable (Hillgren et al., 1995).

3.4.2 Modèle de l'épithélium intestinal reconstitué avec la lignée cellulaire Caco-2

Pour notre étude concernant les effets du Cd sur l'expression des enzymes de biotransformation lors de la différenciation des entérocytes, il est capital de choisir un modèle cellulaire représentatif d'un épithélium intestinal humain. Nous avons ainsi fait appel au modèle cellulaire Caco-2 qui est très souvent utilisé pour étudier les fonctions intestinales ainsi que l'absorption des xénobiotiques (Hidalgo et al., 1989 ; Artursson, 1990 ; Buesen et al., 2002).

La lignée cellulaire Caco-2 est issue d'un adénocarcinome colorectal d'un homme caucasien de 72 ans (Fogh et al., 1977). Elle développe cependant spontanément un phénotype entérocytaire (Zweibaum et al., 1991 ; Sambuy et al., 2005). En effet, ces cellules expriment les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de l'épithélium intestinal (Pinto et al., 1982, 1983 ; Chantret et al., 1988 ; Zweibaum, 1993) : elles forment une monocouche de cellules polarisées mimant la barrière intestinale (Figure 3.5) avec des jonctions serrées et une membrane apicale avec une bordure en brosse typique des entérocytes.

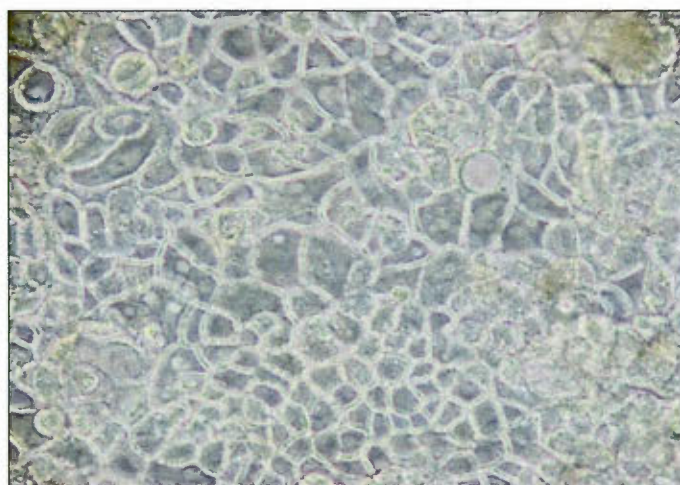


Figure 3.5 Monocouche de cellules Caco-2 (grossie 20 fois) après 21 jours de culture

Une fois les cellulesensemencées, elles entrent en phase proliférative et se multiplient jusqu'à coloniser toute la surface de culture. A ce moment ci, on dit qu'elles ont atteint un stade de croissance stationnaire également nommé confluence et cette promiscuité cellulaire par contact inhibe leur prolifération et marque leur entrée en phase de différenciation (Tian et Quaroni, 1999). Lorsque les cellules sontensemencées à une densité de 12×10^3 cellules/cm², la différenciation débute après 7 jours de culture et s'effectue spontanément une fois la confluence atteinte. Les cellules sont différenciées de manière hétérogène deux semaines post-confluence puis différenciées de façon plus homogène quatre semaines post-confluence (Vachon et Beaulieu, 1992).

Cette différenciation se traduit par la distinction d'un domaine apical et d'un domaine basolatéral, donc par la polarisation des cellules mais également par la formation des jonctions serrées. Au pôle apical va se mettre en place la bordure en brosse très caractéristique (Pinto et al., 1983 ; Hidalgo et al., 1989 ; Zweibaum, 1993). Au niveau des microvillosités sont exprimées des protéines de fonctions caractéristiques des cellules absorbantes. Il s'agit d'enzymes spécifiques telles que l'aminopeptidase N, la γ -glutamyltranspeptidase et des hydrolases comme la lactase et la maltase, mais également des marqueurs de différenciations tels que la sucrase-isomaltase (cette dernière étant spécifique à l'entérocyte) et la phosphatase alcaline (Jumarie et Malo, 1991). En 1985, Rousset et ses collègues ont d'ailleurs montré que la sucrase-isomaltase s'exprimait dans les cellules Caco-2 à un niveau comparable à celui observé dans l'intestin grêle adulte.

Elles expriment également à leur surface, comme dans les entérocytes différenciés, les mêmes protéines de transport de nutriments comme pour les hexoses mais aussi des transporteurs responsables de l'absorption d'acides aminés (Blais et al., 1987 ; Mahraoui et al., 1992). Bien différenciée, la monocouche cellulaire cultivée sur Pétri a tendance à former des dômes (Figure 3.6) démontrant ainsi son aptitude à transporter des ions, des nutriments et de l'eau du côté apical vers le côté basolatéral. Ainsi, leur processus de maturation est analogue à celui de la maturation *in vivo* des entérocytes lors de leur migration le long de l'axe crypte-villosité (Tian et Quaroni, 1999).

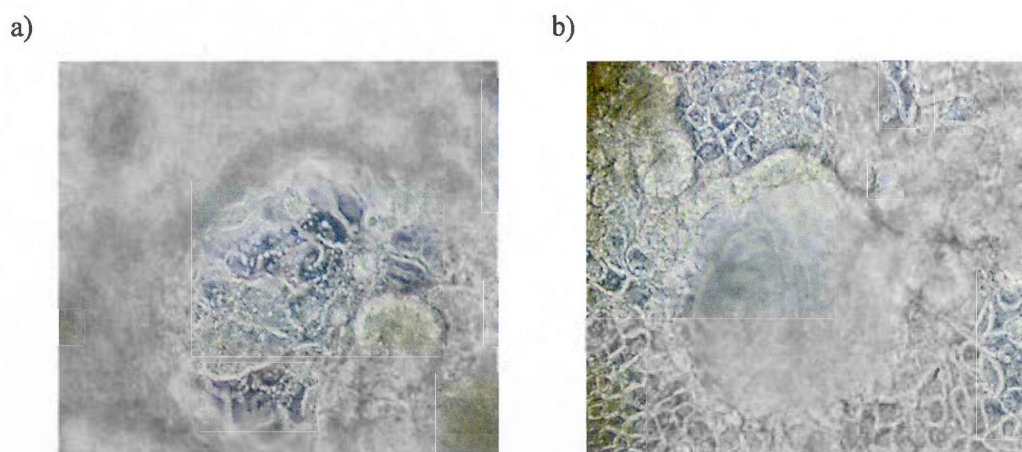


Figure 3.6 Cellules Caco-2 après 21 jours de culture (grossies 20 fois)
 a) mise au point sur le tapis cellulaire (épithélium monocouche)
 b) mise au point sur le dessus du dôme

Tout ceci démontre l'intérêt du modèle cellulaire Caco-2 pour étudier la physiologie et la fonction de l'entérocyte (Hidalgo, 1989 ; Artursson, 1990 ; Buesen et al., 2002) de même que les mécanismes impliqués dans la différenciation (Jumarie et Malo, 1991).

CHAPITRE IV

LES ENZYMES DE BIOTRANSFORMATION D'INTÉRÊT POUR NOTRE ÉTUDE

L'Homme est continuellement exposé à des molécules exogènes naturelles (toxines végétales et animales) ou synthétiques (pesticides, médicaments...) regroupées sous le terme de xénobiotiques dont les métaux font partie. Après absorption par voie orale, les xénobiotiques hydrosolubles sont éliminés aisément de l'organisme via les liquides biologiques (urines, bile) ou les fèces. Mais ces composés sont le plus souvent liposolubles et s'accumulent dans les tissus riches en lipides (système nerveux, foie, reins). Pour éviter toute accumulation susceptible d'engendrer une toxicité, l'organisme a développé un processus de défense, la « détoxication » comportant deux étapes : la métabolisation (réaction de biotransformation) et l'excrétion.

Etant donné la haute capacité des entérocytes à lier le Cd et de ce fait à l'accumuler, ainsi que le rôle protecteur de la biotransformation, nos travaux s'intéressent à l'effet potentiellement perturbateur du Cd sur cette fonction intestinale importante pour l'organisme.

4.1 La biotransformation : une stratégie importante de défense de l'organisme

La biotransformation (transformation métabolique) consiste en la transformation chimique d'une substance par des réactions impliquant généralement une catalyse enzymatique. On parle souvent de métabolisme de substances exogènes en sous-produits (métabolites) plus polaires, plus hydrophiles. Elle a pour but de diminuer la toxicité potentielle d'une substance mère en la convertissant en formes plus hydrosolubles, formes plus facilement et plus rapidement excrétées dans l'urine et/ou la bile. Elle peut donc être considérée comme un mécanisme de « détoxication » par l'organisme. Cependant, ce terme n'est pas toujours approprié car, dans certains cas, les métabolites

sont plus toxiques que la molécule mère : de telles réactions sont qualifiées de "bioactivation". De nombreux produits chimiques subissent une biotransformation dans les organes et les tissus. Le site principal de ces réactions est le foie en raison de sa situation « carrefour », son débit sanguin élevé, son propre système sanguin (système portal), la richesse enzymatique de ses cellules et son rôle de filtre vis à vis des composés exogènes et endogènes. Viennent ensuite les poumons, les reins, l'intestin, l'estomac et la peau (Surveillance Environnement Marin Estuarien, 2005). Au niveau subcellulaire, les réactions de biotransformation ont surtout lieu dans le réticulum endoplasmique (lisse) (systèmes enzymatiques microsomaux) et le cytosol (enzymes cytosoliques) (Claverie et Hedde, 2008) mais aussi dans les mitochondries.

La biotransformation intestinale, ou pulmonaire, se faisant au lieu d'absorption avant l'entrée dans la circulation sanguine est appelée « effet de premier passage ». Ceci a pour conséquences de diminuer l'absorption et la biodisponibilité de la substance mère, et parfois diminuer l'excrétion (cycle entéro-hépatique, réabsorption rénale) et favoriser l'hépatotoxicité ou la toxicité rénale.

4.1.1 Les réactions majeures de biotransformation

En 1959, Williams a divisé les réactions de biotransformation en deux principaux types : les réactions de phase I et les réactions de phase II.

Les réactions de phase I nécessitent des enzymes qui vont catalyser trois types de réactions : oxydation, réduction et hydrolyse. Ces réactions libèrent ou introduisent un groupement fonctionnel (-OH, -NH₂, -COOH ou -SH) permettant ainsi l'augmentation de la polarité du produit parent. Les réactions les plus courantes sont des mono-oxygénations dépendantes des cytochromes P450 (CYP450). C'est essentiellement au cours de ces réactions de phase I qu'il y a plus de risque de produire des métabolites toxiques (bioactivés) (Figure 4.1).

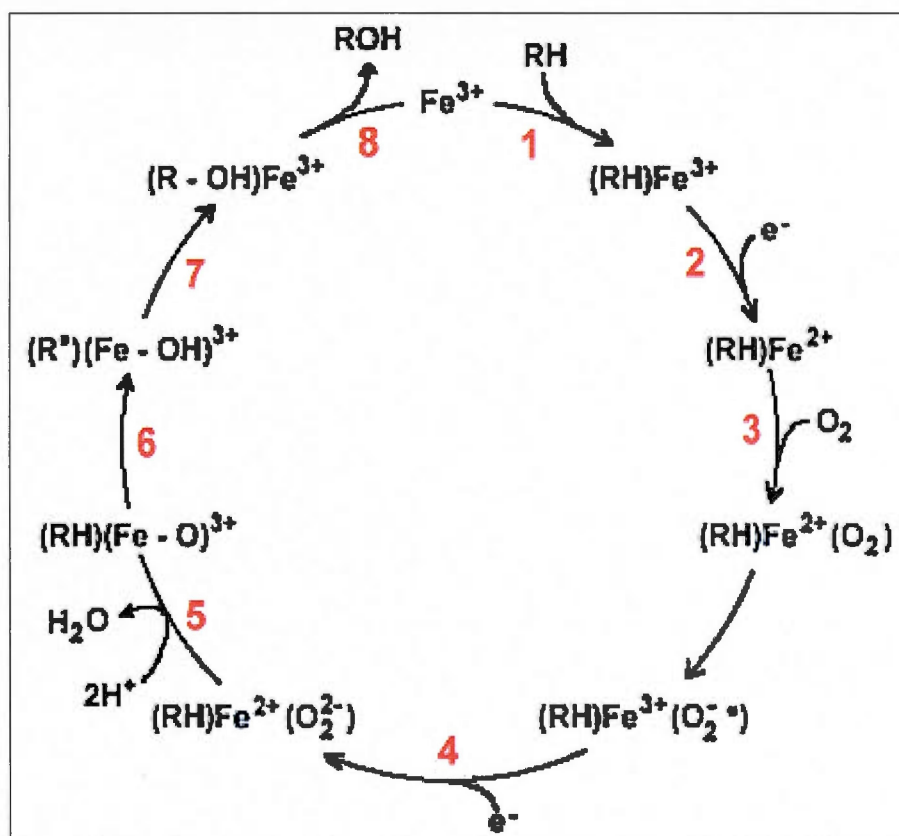


Figure 4.1 Etapes du cycle catalytique du CYP450 (Tiré de http://seme.uqar.qc.ca/15_ecotoxicologie/illustration_ecotoxicologie.htm)

Les réactions de phases II sont également appelées réactions de « conjugaison ». Elles impliquent les groupements fonctionnels générés (métabolites fonctionnalisés) en phase I, ou bien se font directement sur le xénobiotique qui les possède. Elles sont catalysées par des transférases qui permettent l'ajout d'un radical hydrophile provenant d'un donneur endogène. Il existe de nombreuses réactions de conjugaison :

- ✓ Les réactions de conjugaison aux acides aminés dont la glycine, la glutamine et la taurine.
- ✓ Les réactions de conjugaison au sulfate (sulfoconjugaison ou sulfatation) dans lesquelles il y a transfert d'un sulfate provenant du PAPS (3-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate) produit à partir d'ATP et de SO_4^{2-} via des sulfotransférases (situées dans la fraction cytosolique). Le coenzyme est le PAPS. Les groupes

fonctionnels nécessaires pour la formation de sulfates sont les phénols, les alcools aliphatiques et les amines aromatiques (Pizzol, 2003).

- ✓ Les réactions de conjugaison à l'acétate (acétylation) dans lesquelles il y a transfert d'un acétate provenant d'une coenzyme acétylée (l'acétyl Co-A) via des N-acétyltransférases.
- ✓ Les réactions de conjugaison aux groupements méthyl (méthylation) au niveau desquelles il y a transfert d'un groupement méthyl provenant du S-adénosylméthionine via des méthyltransférases pour la plupart cytosoliques.
- ✓ Les réactions de conjugaison à l'acide glucuronique (glucuronoconjugaison) dans lesquelles il y a transfert d'un groupement glucuronyl de l'acide uridine diphosphate (UDP) via les UDP-glucuronosyltransférases cytosoliques.
- ✓ Et enfin les réactions de conjugaison au GSH où il y a transfert du groupement sulfhydryl de la cystéine du GSH par la glutathion S-transférase exclusivement cytosolique.

Ces conjugaisons rendent les molécules à caractère polaire (obtenues à la suite de la phase I) un peu plus hydrophiles et moins toxiques, facilitant ainsi leur élimination. C'est l'ensemble [métabolites-molécule de conjugaison] qui sera éliminé, d'où l'importance de la présence d'une réserve de molécules de conjugaison qui est souvent limitante (Pizzol, 2003).

4.2 Le cytochrome P450 (CYP450)

4.2.1 Généralités

Le CYP450 est associé à la face interne du réticulum endoplasmique lisse qui est très impliquée dans la dégradation des xénobiotiques, en particulier des médicaments. Chez les mammifères, et notamment l'Homme, on trouve le CYP450 dans presque tous les tissus, sauf dans le muscle, les os et les globules rouges (Bertrand- Thiebault, 2004). Il

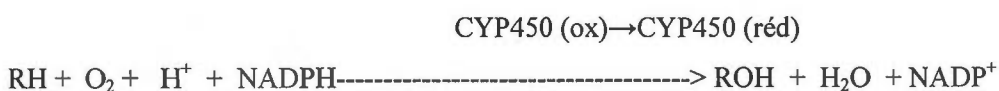
faut savoir que le terme cytochrome P450 recouvre un grand nombre d'iso-enzymes qui se subdivisent en différentes familles et sous-familles en fonction de leurs ressemblances dans la séquence des acides aminés. Elles ont toutes en commun un thiolate comme ligand axial du fer au centre de l'hème. Les familles sont désignées par un chiffre (par exemple, CYP2), les sous-familles par une lettre (par exemple, CYP2A) tandis que les iso-enzymes individuelles sont désignées de nouveau par un chiffre (par exemple, CYP2A4). Une trentaine d'iso-enzymes ont été identifiées chez l'Homme et il y a une grande variabilité inter-individuelle dans l'activité enzymatique du CYP450 pouvant entraîner des modifications de paramètres pharmacocinétiques. Les deux causes majeures de cette variabilité sont les facteurs génétiques et les interactions avec des médicaments ou d'autres substances (inhibition ou induction) (Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique, 1999). La distribution de la plupart de ces enzymes n'est pas uniforme le long du tractus gastro-intestinal humain ; elle est généralement plus importante dans la région proximale du petit intestin (Thelen et Dressman, 2009).

Un système à cytochrome P450 est en réalité un complexe multienzymatique composé de deux flavoprotéines formant deux chaînes de transporteurs d'électrons (la NADPH cytochrome P450 réductase et la NADH cytochrome b5 réductase) et de deux hémoprotéines (le cytochrome P450 et le cytochrome b5), ces deux dernières étant constituées d'une porphyrine complexée avec un atome de fer pouvant passer de l'état ferreux (Fe^{2+}) à l'état ferrique (Fe^{3+}) de manière réversible, ce qui confère des propriétés d'oxydo-réduction au cytochrome P450. L'hème constitue la partie prosthétique et ses noyaux porphyrine sont fixés par des liaisons covalentes aux groupements thiols des résidus cystéine de la partie protéique du cytochrome.

Les CYP450 interviennent dans les réactions d'oxydation de phase I et sont des enzymes inductibles par leurs substrats. Cette inductibilité nécessite l'activation de récepteurs nucléaires qui activent la transcription des gènes codant pour les CYP450. La biotransformation de nombreux produits chimiques implique des processus oxydatifs et l'oxydation est quantitativement la réaction majeure de biotransformation en phase I. Le dénominateur commun de toutes les réactions auxquelles participent les CYP450 est l'insertion d'un atome d'oxygène sur un substrat par réduction d'une molécule d'oxygène moléculaire dissous. Le cycle catalytique du CYP450 est un processus d'oxydo-réduction dans lequel le CYP450 agit comme oxydase (enzyme catalysant une réaction d'oxydo-

réduction impliquant une molécule de dioxygène (O_2) comme accepteur) et la NADPH-CYP450 réductase (transfert les équivalents réducteurs). La réaction type est une réaction enzymatique, impliquant le dioxygène et le NADPH comme cofacteur, dans laquelle le CYP450 transforme un substrat hydrophobe (RH) en produit hydrophile (ROH), souvent par l'introduction d'une fonction hydroxyle.

Equation réactionnelle finale :



Lors de la réaction, une molécule de dioxygène est scindée en deux : un atome d'oxygène est introduit dans le substrat ($\text{RH} \rightarrow \text{ROH}$) alors que l'autre atome est réduit pour donner de l'eau ($1/2 O_2 + 2 H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$), ce qui fait du CYP450 une monooxygénase (Guégen et al., 2006).

La réaction catalysée par le cytochrome P450 peut être décrite par un cycle réactionnel (Figure 4.1) qui comporte les différents états redox successifs de la protéine. Il est pratique d'abréger ces états en désignant uniquement l'état du fer au centre de l'hème. Il y a de nombreux transferts d'oxydoréduction dans le cycle catalytique des CYP450 et des étapes critiques peuvent générer des radicaux libres, dont l'anion superoxyde O_2^- et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , échappant au cycle.

Les CYP450 ne sont pas spécifiques à un substrat ; au contraire, ils peuvent catalyser la transformation de milliers de composés différents, ainsi que des médicaments. Si les CYP450 ont une spécificité de substrats très faible, ils sont souvent très spécifiques en ce qui concerne la réaction catalysée : l'isoforme CYP3A4 peut par exemple oxyder presque n'importe quel composé ressemblant aux stéroïdes, mais la réaction catalysée sera toujours une hydroxylation en position 6α .

4.2.2 Iso-enzyme CYP1A1

4.2.2.1 Généralités

Cette iso-enzyme est induite par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) générés par des processus de combustion partielle de la matière organique à haute température. Ce sont des procarcinogènes d'origine pyrolytique (IARC, 1983 ;US-EPA, 1985) principalement dû à des phénomènes naturels tels que les feux de forêts, de prairies et les éruptions volcaniques. Mais aujourd'hui, l'origine pyrolytique anthropique représente la source majeure de HAP dans l'environnement, notamment à cause des émissions domestiques et industrielles. Les HAP coexistent dans l'atmosphère à la fois en phase gazeuse et en phase particulaire. Certains d'entre eux sont toxiques car une fois absorbés ils peuvent subir des transformations sous l'action de CYP450 et former des époxydes et/ou des dérivés hydroxylés, molécules biologiquement actives qui peuvent se lier aux protéines, à l'ARN ou à l'ADN (Xue et Warshawsky, 2005) et provoquer des dysfonctionnements cellulaires (Schreiberl et al., 2006 ; Haritash et Kaushik, 2009).

L'humain est continuellement exposé à divers HAP et des études révèlent qu'ils sont beaucoup plus ingérés qu'inhalés (Jacob et Grimmer, 1996 ; EFSA, 2008). Dans l'intestin humain, l'expression constitutive du CYP1A1 est faible mais hautement induite par les HAP présents dans la nourriture (Fontana et al., 1999) et principalement régulée par le récepteur AhR (aryl hydrocarbon receptor). Ainsi, si l'alimentation contient beaucoup de HAP, le niveau d'expression intestinal du CYP1A1 est très élevé. Les HAP sont des substrats de l'isoforme CYP1A1. En 1996, Carrière et son équipe ont montré une diminution d'expression de l'ARNm du CYP1A1 dans deux populations clonales isolées à partir de la lignée Caco-2 : TC7 et PF11, dès l'approche de la confluence, donc une chute d'expression en fonction du stade de différenciation. Aussi, ils ont remarqué une absence d'expression basale de cette ARNm entre le quatrième et vingtième jour de culture des cellules Caco-2 contrôles (Carrière et al., 1998).

4.2.2.2 CYP1A1, récepteurs AhR et cadmium

Les cellules des mammifères contiennent une grande variété de récepteurs qui ont une affinité pour des substances toxiques de l'environnement. Par exemple, la dioxine, qui appartient à la famille des HAP, est reconnue par les récepteurs AhR présents dans le cytosol des cellules cibles et s'y fixe. Ce complexe cytosolique dioxine-AhR possède une affinité pour une protéine de translocation Arnt (aryl hydrocarbon nuclear translocator) qui permet de franchir la membrane nucléaire, favorisant ainsi la pénétration de ce nouveau complexe dioxine-AhR-Arnt dans le noyau. Ce dernier complexe agit comme facteur de transcription sur l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE : xenobiotic response element) sur le promoteur du gène concerné, comme c'est le cas pour le gène du CYP1A1. Cette fixation au XRE va permettre de recruter l'ARN polymérase favorisant la transcription des gènes cibles, dont beaucoup codent pour des enzymes de détoxification, en ARNm. Ainsi le taux de transcription est favorisé par la fixation de facteurs de transcription. Parmi les gènes dits AhR-dépendants figurent ceux codant pour un grand nombre d'enzymes de biotransformation incluant :

- ✓ des enzymes de phase I telles que le CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 et CYP2s1
- ✓ des enzymes de phase II telles que la NAD(P)H-Nqo1 (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-quinone oxidoréductase), la GSTA1 (glutathion-S-transferase A1) et l'UGT1A6 (UDP-glucuronosyltransférase) (Nebert et Duffy, 1997 ; Rivera et al., 2002).

Il est alors important qu'il règne une bonne coordination entre activité des enzymes de phase I et de phase II de façon à éviter toute accumulation de métabolites intermédiaires potentiellement toxiques. La biotransformation des substrats du CYP1A1 est importante pour la survie de la cellule car elle contribue à leur élimination. Cependant, les CYP450 sont capables de générer des espèces oxygénées réactives (ROS : Reactive oxygen species) telles que des époxydes et des époxydes dihydrodiols à partir de HAP (Elbekai et al., 2004). Ces ROS sont la cause d'un grand nombre de réponses toxiques car elles peuvent s'attaquer aux composés vitaux des cellules (Poland et Knutson, 1982). Ce sont des espèces chimiques à très forte réactivité capables d'oxyder les protéines, l'ADN et les lipides des membranes cellulaires. Ainsi, le récepteur AhR contrôle l'expression de

plusieurs enzymes de biotransformation responsables de la métabolisation de nombreux composés aromatiques.

Plusieurs études ont rapporté la capacité des ROS tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à inhiber l'expression du CYP1A1 (Morel et Barouki, 1998, 1999). La réduction de l'activité du CYP1A1 durant un stress oxydatif serait probablement due à une réponse adaptative des cellules pour minimiser leur dommage. Vraisemblablement, la suppression de cette activité diminuerait les conséquences carcinogènes et mutagènes ainsi que la production de plus de ROS (Park et al., 1996). En outre, le stress oxydatif peut modifier l'expression des gènes AhR-dépendants ce qui suggère qu'une co-exposition à des ligands d'AhR et à divers polluants environnementaux comme certains métaux lourds pro-oxydants perturberait la régulation coordonnée d'enzymes AhR-dépendantes de phase I et phase II (Maier et al., 2000 ; Elbekai et El-Kadi, 2004). De récentes études ont montré que des métaux comme le Cd peuvent favoriser un stress oxydatif dans des cultures de cellules humaines (Stohs et Bagchi, 1995 ; Nieboer et Fletcher, 1996 ; Bagchi et al., 2000), notamment en réduisant l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la superoxide dismutase (Shaikh et al., 1999) et la catalase (Hussain et al., 1987). D'après deux études d'Elbekai et El-Kadi sur des hépatocytes murins, le Cd seul n'induit pas l'activité du CYP1A1 mais induit une augmentation des niveaux d'ARNm et d'activité de la QOR (Quinone oxydoreductase) et de la GSTYa (Elbekai et El-Kadi, 2004; 2005). Une co-administration de Cd et de ligand à AhR inhibe l'activité du CYP1A1 mais potentialise l'expression de son ARNm. Une autre étude a montré que le Cd augmente les niveaux d'ARNm de la GSTYa dans des cellules épithéliales alvéolaires de rat (Shukla et al., 2000). Il a été également montré qu'il pouvait à la fois diminuer et augmenter le métabolisme relié à l'activité du CYP450 avec des réponses différentes selon la dose et le sexe de l'individu (Furst et Mogannam, 1975 ; George et Young, 1986). En 2000, Maier et ses collègues ont testé l'effet d'une co-exposition au Cd et à des ligands d'AhR sur l'expression des gènes AhR-dépendants et les réponses au stress oxydatif sur des hépatocytes de souris. Leur étude suggère qu'une exposition combinée Cd-HAP qui n'est pas rare dans la réalité peut altérer la biotransformation (phase I et phase II) des HAP. Ainsi, le Cd responsable d'un stress oxydatif additionnel à celui causé par la présence de ligands AhR serait alors impliqué dans l'activation des AhR qui induisent la transcription du gène *Cyp1a1* en ARNm, mais diminuerait l'activité CYP1A1. Par conséquent, les ROS activeraient AhR. Le Cd

affecterait donc l'activité CYP1A1 en agissant au niveau transcriptionnel et posttranscriptionnel (Elbekai et El-Kadi, 2007). Plusieurs mécanismes ont été proposés. Par exemple en 2001, Bogdan suggéra que l'augmentation de la production de ROS favorisée par la présence de Cd pourrait être responsable de l'oxydation des groupements thiols des résidus cystéines de l'enzyme. Il a également été proposé que le métal se lierait directement à l'apoprotéine (Spink et al., 2002).

4.2.2.3 CYP1A1 et P-gp

Des études ont montré que l'épithélium intestinal forme une sorte de barrière biochimique contre certains HAP comme le benzo- α -pyrène formée de l'action conjointe de CYP1A1, de CYP1B1, de sulfotransférases et de protéines de transport appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) (Buesen et al., 2002, 2003). Les métabolites de benzo- α -pyrène-sulfatés sont activement transportés hors de l'entérocyte. En 2004, Lampen et ses collègues ont montré que l'induction du gène de la glycoprotéine (P-gp), un transporteur ABC dont l'expression varie avec l'état de différenciation dans les cellules Caco-2 (Anderle et al., 1998), dépendait de la concentration de HAP. Ce résultat est très surprenant étant donné que le benzo- α -pyrène n'est pas un substrat de la P-gp (Schuetz et al., 1998) et que les inhibiteurs de la P-gp n'inhibent pas le transport des métabolites du benzo- α -pyrène dans les cellules Caco-2 (Buesen et al., 2002, 2003). De même en 1999, Fontana et ses collègues ont indiqué que la P-gp n'était pas impliquée dans le transport de benzo- α -pyrène vu qu'ils n'avaient pas détecté d'effet de "HAP alimentaires" (provenant de la consommation de viande grillée au charbon de bois) sur ses niveaux d'expression chez des volontaires en bonne santé. Cependant le CYP1A1 et la P-gp sont simultanément surexprimés dans la lignée Caco-2 quand ces cellules sont traitées à l'Aroclor 1254, un mélange de congénères de BPC (Borlack et Zwald, 2003). Ceci suggère donc qu'il existe un lien fonctionnel entre le CYP1A1 et la P-gp (Lampen et al., 2004).

4.2.3 Iso-enzyme CYP3A4

4.2.3.1 Généralités

Dans l'intestin humain, le CYP3A4 est le cytochrome majeur et il est responsable de l'oxydation de plus de 60% des médicaments (Hebert et al., 1992 ; Maurel, 1996 ; Paine et al., 1996, 1997 ; Wacher et al., 2001) et de nombreux stéroïdes synthétiques mais aussi endogènes (testostérone, progestérone) (Pelkonen et al., 1998 ; Guengerich, 1999)). Chez l'humain, la famille CYP3A représente environ 70% du contenu intestinal en cytochromes (CYP) (Watkins et al., 1987). Des études montrent que les entérocytes expriment des niveaux relativement élevés de CYP3A4 (Kolars et al., 1994). Cependant, dans les conditions standards de culture, son niveau d'expression dans la lignée Caco-2 est trop faible pour être appréciable. Son expression ainsi que son activité catalytique peuvent être augmentées de façon importante en traitant les cellules Caco-2 pendant deux semaines post-confluence avec de la 1 α ,25-dihydroxy vitamine D₃ (Schmiedlin-Ren et al., 1997a; Aiba et al., 2005 ; Xu et al., 2005 ; Hou et al., 2007 ; Fan et al., 2009). Son activité serait environ trois fois moins élevée dans la lignée Caco-2 stimulée à la vitamine D₃ que dans les entérocytes du jéjunum (Schmiedlin-Ren et al., 1997b).

Après avoir pénétré dans les entérocytes, certaines molécules de médicaments sont métabolisées tandis que celles qui échappent à la conversion métabolique peuvent être « pompées » à l'extérieur de ces cellules et éliminées dans la lumière intestinale via la P-gp. Les molécules à nouveau accumulées dans l'entérocyte sont toujours soumises aux actions des enzymes de biotransformation, notamment le CYP3A4, ce qui réduit davantage leur biodisponibilité. Il est à noter que la spécificité de substrats (molécules médicamenteuses) pour le CYP3A4 et la P-gp se chevaucherait en partie. Ces deux protéines agiraient de façon synergique pour diminuer la biodisponibilité orale de certains xénobiotiques (Watkins, 1997 ; Suzuki et Sugiyama, 2000 ; Engman, 2001). Cette synergie augmenterait l'ampleur de l'action du CYP3A4 intestinal dans le métabolisme des médicaments (Gan et al., 1996). Nous y reviendrons à la section 4.4.2.

4.2.3.2 Iso-enzyme CYP3A4 et récepteurs PXR

L'expression du CYP3A4 est contrôlée par un important système de régulation, notamment par l'activation de facteurs de transcription par des ligands spécifiques (Goodwin et al., 2002). PXR (Pregnane X Receptor) est un récepteur « orphelin » appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires NR1 (Nuclear Receptor gene family 1) (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Plusieurs observations montrent l'implication du PXR dans l'induction de la transcription du CYP3A4 :

- ✓ Tout d'abord, PXR est abondamment exprimé dans le foie, l'intestin grêle, le colon et la glande mammaire, certains de ces tissus étant les sites majeurs d'expression des gènes codant les cytochromes CYP3A (Guégen et al., 2006).
- ✓ D'autre part, PXR est un facteur de transcription qui joue un rôle important dans la modulation de l'expression du CYP3A4. Il agit en s'hétérodimérisant avec le récepteur RXR (récepteur X des rétinoïdes) de l'acide rétinoïque 9-*cis*. Dans ce cas, RXR joue le rôle d'un partenaire actif et l'hétérodimère peut être à la fois activé par l'acide rétinoïque 9-*cis* ou par le ligand du deuxième récepteur (PXR). Cette hétérodimérisation a pour conséquence d'augmenter l'affinité du dimère ainsi formé pour son élément de réponse à l'ADN (XRE) situé sur le promoteur du gène CYP3A4. Cette fixation au XRE va permettre de recruter l'ARN polymérase favorisant la transcription de ce gène cible.
- ✓ Enfin, le récepteur PXR est activé par des composés connus comme inducteurs du CYP3A. PXR est activé par la liaison à de nombreux composés dont des stéroïdes endogènes, des acides biliaires, divers contaminants environnementaux, de nombreux médicaments et compléments vitaminiques (Kliwer et al., 2002; Ma et al., 2008).

Le récepteur PXR est également appelé récepteur SXR (récepteur des stéroïdes et des xénobiotiques). Il a été montré que SXR (PXR) induit l'expression du gène MDR1 (Multiple Drug Resistance) codant pour un transporteur protégeant la cellule contre la xénotoxicité et facilitant l'élimination rapide de nombreux xénobiotiques environnementaux et alimentaires (Synold et al., 2001 ; Sodona et al., 2003). Ainsi, en

induisant le CYP3A4, le récepteur SXR (PXR) joue donc un rôle dans le métabolisme de ces derniers, mais aussi dans leur élimination en induisant MDR1. Ceci sera d'avantage développé dans la section 4.4.2.

4.3 Les glutathion S-transférases (GST)

4.3.1 Généralités

Les glutathion-S-transférases (GST) sont des enzymes de biotransformation de phase II et sont présentes dans de nombreux tissus. Chez l'Homme, elles appartiennent à une superfamille composée de sept classes d'enzymes cytosoliques solubles appelées α , μ , π , θ , ω , σ , ζ , ou respectivement A, M, P, T, O, S, Z, d'une classe mitochondriale (κ) ou GSTK et d'une classe d'enzymes microsomaux MGST, toutes constituées de plusieurs sous-unités et chacune ayant une spécificité de substrats plus ou moins stricte et un profil d'expression tissulaire propre. Mais les plus abondantes sont celles de la classe α , μ et π chez l'Homme. Les GST peuvent avoir des activités peroxydase, isomérase ou thiol transférase. Les GST sont souvent étudiées, concernant la prévention de la pollution dans l'environnement, pour leur activité de catalyse des réactions de conjugaison entre le GSH, synthétisé par la γ -GCS (γ -glutamylcystéine synthétase) et la GSH synthétase, et des molécules électrophiles ayant la capacité de réagir dangereusement avec des macromolécules comme les acides nucléiques (ARN, ADN) ou de générer un stress oxydatif. La catalyse de la conjugaison au GSH avec certains substrats est une étape importante car elle permet la formation de composés moins toxiques et plus hydrosolubles (Chatterjee & Bhattacharya, 1984). En effet, les conjugués subissent ultérieurement une coupure enzymatique et une acétylation pour former des dérivés N-acétylcystéine (acides mercapturiques) facilement excrétés dans les urines (Chasseaud, 1976).

L'expression de GST est modulée par divers xénobiotiques dont à ce jour une centaine ont été identifiés comme inducteurs de GST. Nombreux d'entre eux seraient eux-mêmes substrat de ces enzymes, directement ou indirectement après avoir été métabolisés par le système CYP450. En effet, ce système est capable de générer des métabolites toxiques dits "bioactivés" et notamment des espèces oxygénées réactives

comme on a pu le voir auparavant. Ces dernières étant voraces d'électrons, elles vont ainsi être prises en charge par la GST qui va catalyser leur conjugaison au GSH, inhibant de la sorte leur potentiel toxique. L'expression des GST est complexe car influencée par de nombreux facteurs (sexe, âge, espèce...) et son induction suggère qu'elle représente un mécanisme de réponse adaptative à un stress chimique causé par des électrophiles (Hayes et Pulford, 1995). Son induction suggère également la présence d'un stock suffisant et disponible de GSH qui est souvent limitant (Pizzol, 2003). Ceci illustre l'importance du maintien d'une bonne coordination entre enzymes de phase I et phase II afin d'éviter tout dérèglement dans l'homéostasie de détoxification.

4.3.2 Isoforme GSTP1 d'intérêt dans la lignée Caco-2

De nombreuses études ont montré que la lignée Caco-2 et les cellules coliques humaines expriment tout particulièrement les GST de la classe α et de la classe π . Chez l'humain, la classe π ne contient qu'un seul gène codant pour la protéine glutathion *S*-transférase P1 (GSTP1) qui est une protéine dimérique (homo- ou hétérodimérique) cytosolique. Elle est majoritairement exprimée dans le poumon, le sein, le gros intestin ou la vessie (Terrier et al., 1990 ; Commandeur et al., 1995). Dans la lignée Caco-2, il a été montré que l'expression de GSTP1 augmente en cours de différenciation et devient quasiment six fois plus importante que pendant la phase de prolifération (Scharmach et al., 2009).

4.3.3 Isoforme GST- π et cadmium

En 2000, Shukla et ses collègues ont exposé des cellules épithéliales alvéolaires de rat au Cd (sous forme de CdCl₂) afin d'étudier son effet sur la GST- π . Ils ont montré que cette exposition cause une réduction transitoire du stock de GSH entraînant à son tour une augmentation de la production et de l'accumulation cellulaire de ROS. Pour maintenir l'homéostasie rédox de la cellule et faire face à cet excès de ROS générés indirectement suite à l'exposition au Cd (Kasprzak, 1995), on observe une activation de la transcription des gènes codant pour la γ -GCS (γ -glutamylcystéine synthetase), enzyme catalysant la première étape limitante de la biosynthèse du GSH à partir du glutamate, ce qui favorise ainsi la synthèse d'un stock suffisant et disponible de glutathion. On constate

également l'induction des isoenzymes GST- π et α , ces dernières catalysant leur conjugaison au GSH, inhibant de la sorte le potentiel toxique des ROS produits à la suite d'une telle exposition. De la sorte, l'induction de ces deux enzymes vont ainsi contribuer à une meilleure résistance des cellules à ce métal. Il a été montré que les ROS agissaient comme des messagers d'activation de facteurs de transcription induisant l'expression de gène(s). Le facteur de transcription AP-1 (activator protein-1) est connu pour être particulièrement sensible au changement de l'état rédox de la cellule et pour sa capacité à se lier à un élément de réponse spécifique du promoteur, situé en région 5', d'une large gamme de gènes (Hayes et Pulford, 1995 ; Hayes and McLellan, 1999 ; Wild and Mulcahy, 2000). AP-1 se présente comme un hétérodimère protéique résultant des produits des gènes Jun et Fos ou comme un homodimère résultant du produit du gène Jun. Ensemble, les gènes Jun et Fos sont connus pour être rapidement induits dans la cellule en réponse à un stress oxydatif (Arrigo, 1999 ; Rhaman et al., 1999). De même, dans certains systèmes biologiques, AP-1 est connu pour réguler l'activation de la transcription de la γ -GCS (Rahman et al., 1996) et GST- π et α . (Bergelson et al., 1994 ; Hayes et McLellan, 1999). En 2000 Shukla et son équipe de chercheurs ont exposé une hypothèse : le Cd pourrait activer la transcription du gène Jun, ce qui augmenterait les niveaux de AP-1 qui à son tour stimulerait la transcription de GCS et de GST.

4.4 Le transporteur membranaire MDR1 ou glycoprotéine P (P-gp)

4.4.1 Généralités sur la P-gp

La découverte du phénotype MDR (Multiple Drug Resistance) dans des cellules cancéreuses a mis en évidence le rôle de transporteurs membranaires dans l'efflux de molécules pharmacologiques et chimiques diverses. Parmi ces transporteurs, la glycoprotéine P (P-gp) et une protéine apparentée comme la MRP (Multiple-Drug Resistance associated Protein) ont été décrites au niveau des cellules tumorales et participent au phénomène de résistance aux chimiothérapies anticancéreuses (Multi Drug Resistance). En effet, elles agissent comme une protéine transmembranaire qui expulse le médicament hors des cellules, retenant ainsi l'attention des chercheurs de l'industrie pharmaceutique. La P-gp et la MRP se distinguent l'une de l'autre par le fait que la première n'expulse pas les métabolites conjugués au GSH, tandis que l'autre oui.

Les gènes codant pour la P-gp ainsi que pour la MRP appartiennent à la superfamille de gènes codant pour les protéines de transport membranaire qui se lient à l'ATP. Il s'agit de la superfamille des transporteurs ABC qui regroupe, chez l'humain, 48 gènes codant des transporteurs possédant un ou plusieurs domaines de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP). Ces protéines jouent un rôle très important en modulant l'accumulation cellulaire des xénobiotiques par leur implication dans un phénomène d'excrétion active ATP-dépendante, d'où leur contribution au phénotype MDR dans de nombreux cas de cancers. Fonctionnellement, on distingue deux types de P-gp :

- ✓ La classe I qui est la plus vaste et concerne les P-gp transportant une large gamme de xénobiotiques dont de nombreux médicaments. On y trouve les produits du gène humain MDR1 situé sur le chromosome 7.
- ✓ Et la classe II (essentiellement exprimée au niveau du foie) qui comprend les P-gp transportant des composés amphiphiles tels que des phospholipides (Smith et al., 2000) et rassemblant les protéines issues des gènes MDR2 et MDR3 chez l'humain. Cependant, seuls les produits du gène MDR1 confèrent le phénotype MDR (Del Moral et al., 1998).

La P-gp de masse moléculaire d'environ 170 kDa n'est pas une enzyme de biotransformation mais bien un transporteur transmembranaire. Dans les tissus sains, la P-gp est généralement située au niveau de la surface apicale de nombreuses cellules épithéliales d'organes sécréteurs. Des taux significatifs sont exprimés dans les canalicules biliaires du foie (classe II), dans le cortex de la glande surrénale, dans les tubules proximaux du rein mais aussi dans l'intestin grêle et le côlon (Thiebaut et al., 1987).

Au niveau de l'épithélium intestinal, la P-gp est localisée uniquement du côté apical de la membrane plasmique de l'entérocyte, de telle sorte que sa direction de transport est polarisée de la circulation systémique vers la lumière intestinale, faisant d'elle une voie d'élimination intestinale *in vivo* mais aussi une barrière à l'absorption intestinale (Burton et al., 1997). Elle joue donc un rôle important dans la protection contre certains xénobiotiques non conjugués en les pompant activement hors de la cellule contribuant ainsi à réduire leur absorption orale. La P-gp est impliquée dans le transport contre un gradient de concentration d'une large gamme de substrats exogènes et

endogènes, la plupart du temps cationiques (comme le Cd^{2+}) et est souvent surexprimée en présence de ces derniers. Ainsi, c'est un transporteur modulant la biodisponibilité de certains xénobiotiques chez l'Homme. Il se pourrait que son expression soit aussi sensible au stress oxydatif subit par la cellule et donc au taux de GSH.

La quantité de P-gp présente dans les cellules Caco-2 dépendrait des conditions de culture dans lesquelles elles sont maintenues (Hidalgo et Li, 1996). Il a été montré que son niveau d'expression était plus élevé au cours de la phase de prolifération et qu'il diminuait au cours de la différenciation entérocytaire, notamment durant la régénération de l'épithélium intestinal (Goto et al., 2003) tandis que d'autres ont montré le contraire (Seithel et al., 2006).

4.4.2 Synergie P-gp/CYP3A4

En 2001, une étude de Katoh et ses collègues a montré que certains substrats du CYP3A4 et leurs métabolites pouvaient modifier les niveaux de transport (Katoh et al., 2001) de substrats de la P-gp suggérant une relation entre les substrats du CYP3A4 et ceux de la P-gp. En effet, la majorité des substrats et inhibiteurs de la P-gp le sont aussi du CYP3A4. Le gène du CYP3A4 est situé sur le même chromosome que le gène MDR1 et il pourrait y avoir une éventuelle liaison génétique (co-régulation) entre ces deux gènes (Engman et al., 2001), surtout que le CYP3A4 joue un rôle dans le métabolisme des médicaments et la P-gp un rôle dans leur expulsion. En 2001, Synold et ses collègues ont montré que le récepteur SXR (steroid and xenobiotic receptor) régule le CYP3A4 mais également l'efflux de nombreuses molécules médicamenteuses en activant l'expression du gène MDR1 codant pour la P-gp. Une corrélation entre le polymorphisme C3435T de MDR1 et le taux d'expression du CYP3A4 intestinal a d'ailleurs été observée, mais des investigations sont encore nécessaires pour vérifier l'hypothèse stipulant que la mutation C3435T serait liée à une quelconque mutation sur le gène CYP3A4 (Goto et al, 2002 ; Marzolini et al., 2004). La P-gp et le CYP3A4 ont une distribution tissulaire très rapprochée et sont tous les deux présents au niveau des entérocytes ; ils seraient exprimés de façon concomitante au niveau du jéjunum, du côlon et du rein, et possèderaient des inducteurs ainsi que des substrats communs. Ceci supporte l'hypothèse d'une action synergique pour minimiser l'exposition aux xénobiotiques (Synold et al., 2001 ; Cornaire

et al., 2002). Toutefois, bien que ces deux systèmes fonctionnent en coopération, leur régulation spécifique est distincte et s'effectue de façon séparée.

Ainsi, si nous observons que le Cd modifie l'expression du CYP3A4, il serait intéressant de voir si cela entraîne aussi des variations d'expression de la P-gp.

4.4.3 P-gp et cadmium

Il a été montré qu'après une exposition à des concentrations croissantes de Cd (1, 5, 10 μ M), il y avait une augmentation dose-dépendante de l'expression de la P-gp (Huynh-Delerme et al., 2005). En 1990, Chin et ses collègues ont testé l'effet de deux stress environnementaux, tels qu'un choc thermique caractérisé par une élévation brutale de la température (agression physique) et une exposition à des métaux lourds toxiques (agression chimique) dont le Cd, sur la lignée cellulaire humaine HTB-46 issue d'un adénocarcinome rénal dans le but d'étudier l'impact sur l'induction du gène MDR1. Il est bien connu que la plupart des cellules répondent à ce genre d'agression en induisant leurs gènes de réponse au choc thermique, les HSP (heat shock protein) (Burdon, 1986 ; Bienz et Pelham, 1987). Ainsi, Chin et al. (1990) ont rapporté que le promoteur du gène MDR1 possédait deux éléments de réponse au choc (stress) thermique HSE (Heat Shock Element) et qu'une élévation de la température ainsi que d'autres agents inducteurs de stress tel le Cd augmentaient de 7 à 8 fois les niveaux d'ARNm de MDR1. Ceci montre que l'expression de la P-gp est influencée par des facteurs environnementaux et qu'un traitement au Cd l'augmente. La coordination entre de nombreuses activités enzymatiques est capitale au bon fonctionnement du processus de métabolisme des xénobiotiques. En 1996, Ishikawa et ses collègues ont montré que le Cd induisait de façon coordonnée MRP et γ -GCS (γ -GCS étant impliquée dans la biosynthèse de GSH) dans des cellules leucémiques humaines.

De façon intéressante, une autre étude concernant l'effet du Cd sur des cellules du tube proximal du rein a montré que le Cd augmentait indirectement l'expression du gène MDR1 par la production de ROS et que cette expression accrue protégeait les cellules contre l'apoptose induite par les ROS (Thévenod et al., 2000). Ce processus de défense impliquerait l'activation du facteur de translocation nucléaire NF- κ B, surexprimé dans les

tissus cancéreux comparativement aux tissus sains, via la production de ROS induite par le Cd. De même, une autre investigation menée sur des hépatocytes de rat s'est intéressée à l'implication des ROS dans l'expression de la P-gp (Zieman et al., 1999). Tout d'abord il faut savoir que chez les rongeurs, il a été identifié deux isoformes de MDR1 similaires : *mdr1a* et *mdr1b*. Les auteurs ont démontré que l'addition d'agents oxydants, tels que le H_2O_2 ou l'inhibiteur de la catalase 3AT (3-amino-1,2,4-triazole) qui empêche la destruction de H_2O_2 , stimulait l'expression des transporteurs MDR1b tandis que l'addition de composés antioxydants tel que le DMSO la diminuait. Ces deux études renforcent donc l'hypothèse que la régulation du gène MDR1 est sensible au potentiel rédox de la cellule.

CHAPITRE V

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHES

5.1 Problématique

Comme décrit auparavant, le Cd est un métal lourd dont la toxicité n'a éveillé l'attention qu'à partir des années cinquante avec la découverte de la maladie Itai-Itai. Depuis les années 80, l'utilisation de ce métal connaît un essor foudroyant grâce à ses propriétés chimiques et ses applications technologiques intéressantes utilisées dans de nombreux secteurs d'activités industrielles et la métallurgie. Il représente un problème de santé humaine étant donné que l'ingestion est une des voies d'exposition majeure avec l'inhalation. De nombreux aliments sont riches en Cd et l'apport alimentaire quotidien peut augmenter de façon importante la teneur corporelle en Cd. Si la biodisponibilité orale du Cd n'est que de 2 % à 5 %, c'est que l'absorption intestinale se fait essentiellement par voie transcellulaire et que la rétention intestinale est très importante.

Ce métal est connu pour affecter la viabilité des entérocytes ainsi que l'intégrité de l'épithélium intestinal, notamment en agissant au niveau des jonctions serrées, augmentant de la sorte la perméabilité paracellulaire. Certaines études ont montré que le cycle cellulaire (prolifération et différenciation) ainsi que les voies de signalisation cellulaires peuvent être la cible de métaux comme le Cd. Le Cd accumulé dans les entérocytes perturberait les voies de signalisation impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et aurait des conséquences autant sur le processus de prolifération que de maturation entérocytaire, cette dernière étant déterminante pour l'expression d'enzymes et de transporteurs responsables de l'absorption des nutriments (Misra et al., 2002 ; Thévenod, 2009 ; Mantha et Jumarie, 2010). Ainsi, notre étude s'insère dans le cadre d'un programme de recherche global visant à mieux comprendre les effets du Cd sur une fonction intestinale importante : la biotransformation.

5.2 Hypothèses de travail

L'épithélium intestinal nous protège mais représente malgré tout un organe cible de la toxicité du Cd. En effet, il accumule beaucoup ce métal et est également le siège de réactions de biotransformation des xénobiotiques ingérés. De ces faits, nous pensons que le Cd pourrait altérer cette fonction de défense primordiale de l'organisme face à divers toxiques présents dans l'alimentation quotidienne.

Etant donné que le Cd peut perturber les voies de signalisation cellulaires, nous croyons qu'il pourrait de la même façon modifier l'expression (niveaux et/ou profil) et/ou l'activité d'enzymes de biotransformation, ce qui aurait des répercussions sur le métabolisme de premier passage des médicaments et autres xénobiotiques.

5.3 Objectifs de recherches

L'objectif général de notre recherche consiste à évaluer dans quelle mesure une exposition chronique au Cd pourrait perturber l'expression des enzymes de biotransformation lors de la différenciation des cellules intestinales (estimée à l'aide du modèle Caco-2). A notre connaissance, aucune étude n'a été faite sur l'impact du Cd sur les niveaux d'expression basale.

Le premier objectif a été tout d'abord de bien caractériser le profil d'expression des enzymes de biotransformation d'intérêt en fonction du state de différenciation entérocytaire des cellules Caco-2. Le second objectif a ensuite été d'évaluer si une exposition chronique au Cd modifie ce profil de même que les activités enzymatiques. Aussi, nous avons cherché à évaluer l'effet du Cd sur la différenciation en mesurant son impact sur l'activité de la phosphatase alcaline, cette dernière étant un bon marqueur de différenciation.

Le but ultime est d'évaluer l'effet d'une exposition au Cd sur le métabolisme d'autres xénobiotiques comme les médicaments et l'impact possible sur la cinétique de métabolisme.

CHAPITRE VI

MATÉRIEL ET MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

6.1 Culture cellulaire

Nous avons travaillé avec la lignée cellulaire Caco-2 étant donné qu'elle possède plusieurs particularités des entérocytes matures *in vivo*. Elle nous a été gentiment fournie par le Docteur Zweibaum (Grasset et al., 1984) et a été utilisée à l'intérieur d'une fourchette de 10-15 passages, soit entre les passages 200 à 215. En effet, il faut noter que la lignée cellulaire Caco-2, dont le phénotype est instable, peut exprimer de façon variable certaines caractéristiques après plusieurs passages successifs. Il est donc extrêmement important de pouvoir disposer d'un stock de cultures congelées à divers passages. Si certaines caractéristiques ne sont plus observées au cours de l'étude, nous devons décongeler des cultures de passages plus précoces.

Les cellules ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's modified eagle essential minimum medium (DMEM) (GibcoBRL, Grand Island, NY, États-Unis) contenant divers acides aminés, dont la L-glutamine qui est importante pour la croissance et la différenciation cellulaire, fournissant la source d'azote, des vitamines et du glucose fournissant la source de carbone et d'énergie. Nous avons toutefois ajouté 10 ml/l d'une solution d'acides aminés non-essentiels (0,1mM) et 1,6 g/l (19 mM) de NaHCO_3 de façon à maintenir le pH constant (pH= 7,1-7,3) grâce à un système tampon qui s'établit entre les 5% de CO_2 de l'incubateur et les ions HCO_3^- . Pour limiter les problèmes de contamination, le milieu contenait également 5 ml/L de pénicilline-streptomycine (antibiotiques) (50,000 U/l-50 mg l⁻¹) (GibcoBRL).

L'ensemble était ensuite filtré sous la hotte à flux laminaire avec un filtre de 0,22 μm stérile, puis nous y ajoutons 15% de sérum de veau fœtal (FBS : fetal bovine serum) (PAA Inc., Montréal, Québec, Canada) inactivé (inactivation des facteurs de coagulation pendant 35 minutes à 56°C). Le FBS est le plus largement utilisé en culture cellulaire. Il

apporte surtout les facteurs de croissance et des protéines d'adhésion (telles que la fibronectine qui permet l'ancrage des cellules).

Les cellules étaient repiquées toutes les semaines par trypsinisation (0,05% de trypsine-0,53 mM d'EDTA). Le succès de la trypsinisation repose sur l'élimination de toute trace de sérum dans la culture qui inhiberait l'action de cette enzyme. Les cellules en suspension étaient ensuite dénombrées avec une cellule de Malassez (hématimètre) et ensemencées dans des flasques de 75 cm² (Corning Inc., Corning, NY, Etats-Unis) de façon à avoir un stock de matériel cellulaire. Le mot "passage" désigne le processus de trypsinisation et fait référence au nombre de fois qu'une culture stock a été repiquée. Pour les expériences, les cellules ont été ensemencées à une densité de 12×10^4 cellules/cm² sur des Pétri de 10, 35 et 100 mm de diamètre (Corning Inc.) et des microplaques de 96 puits (Sarstedt, Numbrecht, Allemagne). Le milieu de culture était changé tous les deux à trois jours. Les cellules étaient maintenues pendant 7 à 21 jours en accord avec la phase de prolifération et de différenciation débutant à confluence (Jumarie et Malo, 1991 ; Jumarie et al., 1999).

6.2 Test de viabilité cellulaire

La mesure d'activité MTT (3-[4,5-diméthyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, Etats-Unis) est une mesure de viabilité cellulaire évaluant l'activité des déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes. Il s'agit d'un test colorimétrique qui consiste à mesurer la réduction du substrat MTT en bleu de formazan par ces déshydrogénases mitochondriales. Le MTT étant un sel jaune de tétrazolium, une fois réduit, il formera un produit cristallisé de formazan bleu-violet. Ces cristaux violets sont ensuite solubilisés dans du DMSO et la densité optique (DO) est mesurée à une longueur d'onde de 575 nm au spectrophotomètre à lecteur de microplaques (Tecan SpectraFluor Plus) (Esbe Scientific Industries Inc., Canada) (Figure 6.1). Donc plus la mortalité est importante, plus la DO diminue.

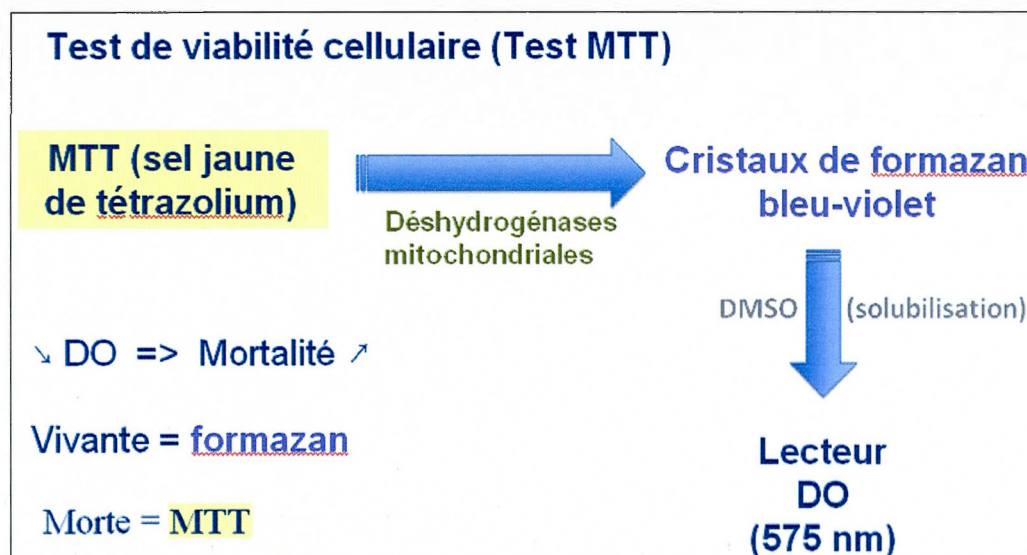


Figure 6.1 Schéma simplifié résumant le test MTT

Grâce à cette technique, nous avons pu déterminer la concentration de traitement des cellules au Cd. Pour cela, nous avons effectué en parallèle trois protocoles d'exposition aux 12 concentrations de Cd suivantes : 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 25, 50, 100, 150, 200 μM dans du milieu de culture standard avec sérum. Ceci nous a permis de déterminer la courbe dose-réponse complète de viabilité cellulaire en réponse au Cd. Cherchant à "perturber" les cultures sans toutefois induire trop de mortalité, et sachant qu'une exposition de 24 h à une concentration de Cd menant à 5% de mortalité (LC5%) est suffisante pour induire une réponse cellulaire (Cardin et al., 2009), nous cherchions la valeur de la LC5% qui serait la concentration de traitement des cultures.

Nous avons procédé selon les trois protocoles d'exposition au Cd suivants, le jour zéro (J0) étant le jour d'ensemencement sur microplaques de 96 puits (Figure 6.2):

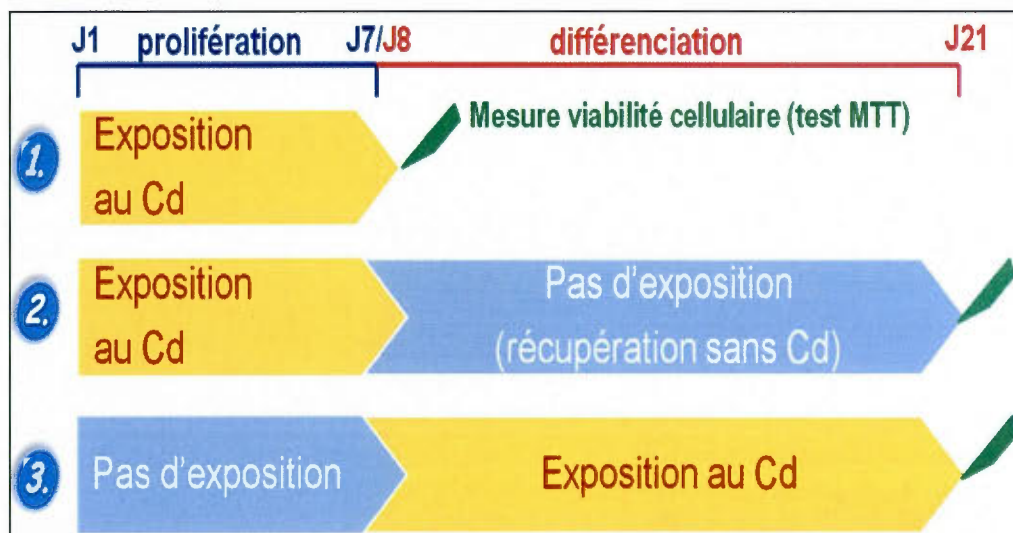


Figure 6.2 Schéma résumant les trois protocoles d'exposition au Cd des cellules Caco-2

PROTOCOLE 1 ciblant la phase de prolifération :

Les cellules Caco-2 ont été exposées au Cd du jour 1 (J1) au jour 7 (J7) à raison de 5 puits pour chaque concentration et l'activité MTT a été mesurée au J7.

PROTOCOLE 2 ciblant la phase de prolifération suivie d'une phase de récupération :

Les cellules Caco-2 ont été exposées au Cd du J1 au J7 puis maintenues en absence de Cd jusqu'au jour 21 (J21) où l'activité MTT a été mesurée.

Ces deux protocoles nous ont permis de déterminer la LC5% en conditions d'exposition à pré-confluence.

Le protocole 2 comporte une phase de récupération des cellules suite à l'arrêt du traitement au Cd, du jour 8 au jour 21. En mesurant le niveau d'expression des enzymes de biotransformation à la fin de cette phase (c'est-à-dire au jour 21), nous pouvions évaluer si un tel traitement en amont se répercute ou non sur leur niveau d'expression après une phase de récupération.

PROTOCOLE 3 ciblant la phase de différenciation :

Du J1 au J7 les cellules étaient maintenues dans du milieu de culture standard avec sérum puis exposées aux 12 concentrations de Cd du J8 jusqu'au J21 où l'activité MTT a été mesurée.

Ce dernier protocole nous permettait d'évaluer la LC5% en conditions d'exposition post-confluence.

Les valeurs des LC5% obtenues seront utilisées pour exposer les cellules selon le protocole correspondant au profil d'expression de l'enzyme étudiée et évaluer si le Cd perturbe cette expression.

6.3 Analyses par RT-PCR

Dans le but de remplir notre premier objectif visant à bien caractériser le profil d'expression des enzymes de biotransformation d'intérêt au cours de la différenciation entérocytaire des cellules Caco-2, nous avons opéré de la façon suivante.

Les cellules témoin non exposées au Cd ont été cultivées pendant 21 jours sur Pétris de 100 mm de diamètre à raison de deux Pétris par passage. L'ARN a été extrait au Trizol (Trizol Reagent) (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) après 7 jours de culture (cellules à confluence et début de différenciation) et après 21 jours (cellules bien différenciées) en suivant le guide d'instructions du fournisseur. Trois µg d'extraits d'ARN obtenus pour chacun des deux jours de culture ont été utilisés pour effectuer une réaction de transcription inverse (RT) dans un volume final total de 30 µl en présence de 10 µM d'amorces hexamines pd(N)6 (Amersham Biosciences, UK) à l'aide du Omniscript RT Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) selon le protocole du fournisseur. L'ADN complémentaire obtenu a été amplifié par PCR à l'aide du Taq PCR Core Kit (Qiagen) en utilisant les amorces d'ADN spécifiques des quatre gènes d'intérêts : le CYP1A1, le CYP3A4, la GSTP1 et la P-gp, ainsi que celui de l'actine. En effet, l'actine a été utilisée comme contrôle interne d'amplification et de chargement sur le gel car c'est une protéine ubiquitaire dont l'expression est constante au cours de la

différenciation entérocytaire, que les cellules soient exposées ou non au Cd. Pour chacun des gènes étudiés, un programme standard de 40 cycles a été utilisé, chaque cycle étant constitué d'une dénaturation à 94°C pendant 1 min, d'une phase d'appariement de 30 s à 58°C et d'une période d'élongation d'une minute à 72°C. Enfin, les produits d'amplification ont été séparés sur gel d'agarose (2% poids/volume) en présence de bromure d'éthidium et visualisés sous lampe UV utilisant un système LKB 2011 Macrovue Fluorescence contrôlé par le logiciel AlphaImager 2200 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, Etats-Unis). La densitométrie des bandes obtenues pour les enzymes de biotransformation a été relativisée à celle de l'actine.

Les amorces ont été préparées classiquement à partir de la séquence d'ADN de chaque gène accessible dans la base de données GeneBank :

✓ **β-actine** (GenBank NM_001101)

sens 5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3'

antisens 5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCC-3'

(bases 332–766) amplicon de 435 pb

✓ **CYP1A1** (GenBank NM_000499)

Sens 5'-GTAATCAGGGCCTCAAGAC-3'

Anti-sens 5'-GACATTGGTCACTGATACC-3'

(bases 195-713) amplicon de 519 pb

✓ **CYP3A4** (GenBank NM_017460)

Sens 5'-TGTGCCTGAGAACACCAGAG-3'

Anti-sens 5'-GTGGTGGAAATAGTCCCGTG-3'

(bases 1655 – 1880) amplicon de 226 pb

✓ **GSTP1** (GenBank NM_000852)

Sens 5'-GGAGACCTCACCCTGTACCA -3'

Anti-sens 5'-GGCTAGGACCTCATGGATCA -3'

(bases 424 – 750) amplicon de 327 pb

✓ **MDR1** (GenBank M14758)

Sens 5'–GCTCCTGACTATGCCAAAGC-3'

Antisens 5'–CAATGCTGCAGTCAAACAGG-3

(bases 3407-3806) amplicon de 400 pb

De la sorte, nous avons obtenu le profil d'expression des quatre gènes au cours de la phase de prolifération et de la phase de différenciation des cellules Caco-2 non exposées au Cd. Ces profils nous ont servi de référence de comparaison avec l'expression dans les cellules exposées au Cd (section 6.4). Ils nous ont aussi permis d'identifier la phase d'expression optimale (prolifération et/ou différenciation) pour chaque enzyme.

6.4 Exposition chronique au Cd

Le second objectif étant ensuite d'évaluer si une exposition chronique au Cd peut modifier l'expression des trois enzymes de biotransformation, et possiblement perturber la fonction de biotransformation intestinale, nous avons opéré de la façon suivante :

1°) Après avoir déterminé les LC5% d'exposition pré- et post-confluence au Cd, nous avons traité les cellules avec cette unique concentration de Cd en effectuant le protocole correspondant (section 6.3). Des cellules ont été parallèlement traitées avec 0,5 μ M de vitamine D₃, seule ou en combinaison avec le Cd pour favoriser l'expression de CYP3A4 (Schmiedlin-Ren et al., 1997a; Aiba et al., 2005 ; Xu et al., 2005 ; Hou et al., 2007 ; Fan et al., 2009), ou avec 500 mM de N-acétylcystéine (NAC) utilisé comme anti-oxydant (Wiseman, 1993) (tableau 6.1).

Tableau 6.1

Tableau résumant les différentes conditions de traitement pour l'extraction de l'ARN

Type de traitement	Période de traitement	Jour d'extraction au Trizol
<u>Ctrl</u> (DMEM + FBS)	Du J0 au J21	J7 et J21
<u>Vit D₃</u> (DMEM + FBS + 0,5 µM Vit D ₃)	Du J8 au J21	J21
<u>Cd</u> (DMEM + FBS + LC5% Cd)	Du J8 au J21	J21
<u>Cd + Vit D₃</u> (DMEM + FBS + 0,5 µM Vit D ₃ + LC5% Cd)	Du J8 au J21	J21
<u>NAC</u> (DMEM + FBS + 500 µM NAC)	Du J8 au J21	J21
<u>Cd + NAC</u> (DMEM + FBS + 500 µM NAC + LC5% Cd)	Du J8 au J21	J21

2°) Puis, comme avec les cellules contrôles, l'ARN des cellules traitées a été extrait au jour 7 et 21, soumis à une réaction de transcription inverse RT puis amplifié par PCR en utilisant les mêmes amorces d'ADN spécifiques. Les produits d'amplification ont été séparés sur gel d'agarose, analysés et comparés à ceux obtenus dans les cellules contrôles.

6.5 Mesure de l'activité phosphatase alcaline

Après avoir déterminé la concentration d'exposition au Cd, nous avons testé l'effet d'une telle exposition sur l'activité de la phosphatase alcaline présente au niveau de la bordure en brosse des entérocytes et des cellules Caco-2 et donc utilisée comme marqueur de différenciation. L'activité de la phosphatase a été mesurée à 37°C sur des homogénats cellulaires selon la méthode de Eichholz (1967) en utilisant le p-nitrophényl

phosphate disodique comme substrat, en colorimétrie à 410 nm au spectrophotomètre DU 640 Beckman Coulter. Un coefficient d'extinction molaire (ϵ) de 2760/M/cm a été utilisé et les résultats sont exprimés en UI (Unités internationales) par mg de protéine, une UI hydrolysant 1 μ mole de substrat par min.

Les cellules maintenues dans les conditions décrites au tableau 6.2 ont été rincées trois fois avec 2 ml de PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) froid à pH 7,4, raclées à l'aide d'un policeman en caoutchouc puis homogénéisées sur glace au polytron PT 1600 E (Kinematica CA) pendant une min. Les échantillons ont ensuite été conservés à -20 °C jusqu'au jour de la mesure. Des mesures ont aussi été faites sur des échantillons contrôles de 21 jours auxquels 1, 3, 5, 10 ou 14 mM de Cd ont été ajoutés dans la cuvette de réaction au moment de la lecture de façon à voir si le Cd pourrait avoir un effet sur l'enzyme en se liant directement sur des thiols fonctionnels et avoir ainsi une action au niveau post-transcriptionnel.

Tableau 6.2

Tableau résumant les différents traitements pour la mesure d'activité de la phosphatase alcaline

Types de traitement	Jours de récolte des cellules et dosage de l'activité de la phosphatase alcaline
<u>Ctrl</u> (DMEM + FBS)	J7, J14 et J21
<u>Vit D₃</u> (DMEM + FBS + 0,5 μ M Vit D ₃)	J14 et J21
<u>Cd</u> (DMEM + FBS + LC5% Cd)	J14 et J21
<u>Cd + Vit D₃</u> (DMEM + FBS + 0,5 μ M Vit D ₃ + LC5% Cd)	J14 et J21

6.6 Mesure de l'activité EROD

Des cellules Caco-2 ont été cultivées sur des Pétris de 100 mm de diamètre pendant 7 et 21 jours selon les conditions indiquées dans le tableau 6.3.

Tableau 6.3

Tableau résumant les conditions de traitements pour la mesure de l'activité EROD

Types de traitement	Jour d'extraction des microsomes	Période de traitement
<u>Ctl</u> (DMEM + FBS)	J7 et J21	Aucun traitement
<u>Cd</u> (DMEM + FBS + LC5% Cd)	J21	Du J8 au J21

Afin de corréler des niveaux d'activité de CYP1A1 à des niveaux d'expression d'ARNm, des fractions microsomales de cellules ont été préparées selon deux protocoles pour en mesurer l'activité d'EROD :

- ✓ Dans le premier, les cellules ont été rincées avec un tampon PBS sans Ca ni Mg, récupérées dans 2,5 ml de tampon d'homogénéisation (2 mM de Tris-HCl et 50 mM de mannitol) contenant les inhibiteurs de protéases suivants ajoutés le jour même : 100 μ M de PMSF et 25 μ g/ml de benzamidine, le pH étant ajusté à 7,0. Les cellules ont ensuite été homogénéisées sur glace pendant 1 min à l'aide d'un polytron PT 1600 E (Kinematica CA) puis soniquées sur glace pendant 30 s. 0,5 ml de cet homogénat a été mis de côté et conservé à -20°C pour le dosage des protéines selon la méthode de Bradford (1976). Le reste a été centrifugé à 5000 g pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé et le culot resuspendu dans 0,5 ml de tampon de resuspension (100 mM de NaH_2PO_4 , 10 mM de MgCl_2 , 20 % de glycérol, pH 7,4) puis centrifugé à 9000 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant obtenu a été centrifugé à 100 000 g pendant 60 min à 4°C et le culot final a été resuspendu dans 0,25 ml de tampon de resuspension puis conservé à -80°C jusqu'au jour de la mesure d'activité EROD.

- ✓ Dans le seconde protocole, les cellules sont rincées deux fois avec un tampon PBS sans Ca ni Mg et détachées de leur support par grattage à sec pour être immédiatement congelées et conservées dans de l'azote liquide. Ensuite elles ont été lentement dégelées sur glace (4°C) en présence de tampon d'homogénéisation (2 mM de Tris-HCl et 50 mM de mannitol) contenant les même inhibiteurs de protéases que précédemment décrits, toujours ajoutés le jour même : 100 μ M PMSF et 25 μ g/ml benzamidine, le pH étant ajusté à 7,0. Cette suspension cellulaire a été soniquée sur glace pendant environ 20 s. 0,5 ml de cet homogénat a été mis de côté et conservé à -20°C pour le dosage des protéines. Le reste a été centrifugé à 9000 g pendant 20 min à 4°C pour se débarrasser des débris nucléaires et cellulaires. Enfin, le surnageant obtenu a été centrifugé à 100 000 g pendant 60 min à 4°C et le culot final a été resuspendu dans 0,25 ml de tampon de resuspension puis conservé à -80°C jusqu'au jour de la mesure d'activité EROD.

L'activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) a été mesurée en suivant la dééthylation de l'éthoxyrésorufine en résorufine fluorescente (λ d'excitation: 563 nm; λ d'émission: 582 nm) (Burke et Mayer, 1974). Un spectrofluorimètre permet de quantifier cette fluorescence dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité de résorufine formée. Nous nous sommes inspirés du protocole de Carrière et al. (1998), de Yuen et Au (2006) ainsi que de celui de Pohl et al. (2006) pour élaborer un protocole adapté à notre étude. L'activité EROD a été mesurée en microplaque de 96 puits en triplicatas pour chaque échantillon. Dans chaque puits 50 μ l de fraction microsomale ont été mélangés à 50 μ l de 7-éthoxyrésorufine (10 μ M) puis incubés pendant 1 min 37°C à l'obscurité. La réaction a été initiée selon deux protocoles :

- ✓ En ajoutant 10 μ l de NADPH (24 mM) dans chaque puits.
- ✓ En ajoutant 10 μ l d'une solution tampon à système de régénération du NADPH (contenant 10 mM de glucose-6-phosphate, 0,5 mM de NADP⁺ et 4 unités de glucose-6-phosphate dehydrogénase/ml) (Chun et al., 2001) .

Ensuite, la microplaque a été incubée à 37°C et une mesure a été prise toutes les 5 min. L'activité a été quantifiée à l'aide d'une courbe étalon établie avec de la résorufine et les résultats sont exprimés en pmol de résorufine produite/mg de protéines microsomaux/min.

6.7 Mesure de l'activité de la GST

Les échantillons ont été préparés d'après la méthode de Pernice et ses collègues (2009). Des cellules maintenues dans les conditions décrites dans le tableau 6.4 ont été récoltées dans du tampon HEDG (25 mM d'HEPES, 1,5 mM d'EDTA, 1 mM de DTT (dithiothréitol) et 10% de glycérol, pH 7,4) et homogénéisées sur glace pendant 1 min à l'aide d'un polytron PT 1600 E (Kinematica CA). 0,5 ml de cet homogénat a été conservé à -20°C pour le dosage des protéines selon la méthode de Bradford (1976) et le reste a été ultracentrifugé à 105 000 g à 4°C pendant 60 min. Le surnageant, fraction cytosolique contenant la GST a été stocké à -80°C jusqu'au jour de la mesure.

Tableau 6.4

Tableau résumant les conditions de traitements pour la mesure de l'activité de la GST

Types de traitement	Jour d'extraction du surnageant cytosolique	Période de traitement
<u>Ctl</u> (DMEM + FBS)	J7 et J21	Aucun traitement
<u>Cd</u> (DMEM + FBS + LC5% Cd)	J21	Du J8 au J21

L'activité des GST a été mesurée à l'aide du CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène) utilisé comme substrat. Ce dernier réagit facilement avec le GSH et de nombreuses iso-enzymes de GST. Le produit de conjugaison formé absorbe la lumière à 340 nm avec un coefficient molaire (ϵ) de 9600/M/cm (Habig et al., 1974). Le protocole a été adapté de la méthode de Habig et ses collègues (1974) mais aussi de Boyland et Chasseaud (1969), de Mannervik (1985) et de Muller et al. (2008). Pour chaque analyse, 900 μ l de cocktail

constitué de 980 μ l de PBS (pH 6,5), 10 μ l de CDNB à 111 mM et 10 μ l de GSH à 111 mM ont été mélangés à 100 μ l d'échantillon puis incubés à 25°C pendant 5 min au spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en UI/mg de protéines cytosoliques.

6.8 Evaluation de l'accumulation cellulaire de Cd après deux semaines d'exposition

Dans le but d'évaluer la quantité de Cd qui s'est accumulée dans les cellules Caco-2 après deux semaines d'exposition post-confluence, les cellules ont été cultivées 21 jours dans les conditions décrites au tableau 6.5 ci-dessous et en présence de 0,5 μ M de ^{109}Cd utilisé comme traceur radioactif (activité spécifique: 3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) en dilution isotopique avec la LC5%.

Tableau 6.5

Tableau résumant les trois conditions de traitement au ^{109}Cd

Types de traitement	Période de traitement	Jour de mesure de l'accumulation de Cd
<u>Cd</u> (DMEM + FBS + LC5% Cd + 0,5 μM ^{109}Cd)	Du J8 au J21	Au J21
<u>Cd + NAC</u> (DMEM + FBS + LC5% Cd + 0,5 μM de ^{109}Cd + 500 μM NAC)	Du J8 au J21	Au J21
<u>Cd + Vit D₃</u> (DMEM + FBS + LC5% Cd + 0,5 μM de ^{109}Cd + 0,5 μM Vit D ₃)	Du J8 au J21	Au J21

Au 21^{ème} jour, le milieu de culture radioactif a été aspiré et les cellules ont été rincées 4 fois avec 2 ml de solution tampon Stop à 4°C (température à laquelle les protéines de transport ne fonctionnent plus) et contenant 2 mM d'EDTA qui est un puissant chélateur utilisé pour arrêter le transport et surtout détacher le Cd adsorbé à la surface membranaire externe des cellules. 500 μ l de NaOH ont ensuite été ajoutés dans chaque Pétri afin d'homogénéiser les cellules. 300 μ l de cet homogénat ont été utilisés

pour compter la radioactivité à l'aide d'un compteur γ (Compugamma CS, modèle 1282, LKB Wallac) et 50 μ l ont été utilisés pour le dosage des protéines selon la méthode de Bradford (1976) après avoir été dilués dans de l'eau nanopure. Les résultats sont exprimés en η mol de ^{109}Cd accumulé/mg protéines cellulaires.

6.9 Résistance transépithéliale des monocouches de cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 ont été cultivées pendant 21 jours sur filtres Transwell de polycarbonate ayant un diamètre de 24 mm et des pores de 0,4 μ m (Corning Incorporated, CoStar, NY 14831, Etats-Unis). Tous les 3 jours environ, la résistance électrique à travers la monocouche épithéliale a été mesurée grâce à un voltmètre EVOM-G (World Precision Instruments, Sarasota, FL). La résistance basale inhérente au filtre seul a été soustraite des valeurs mesurées sur cellules contrôles et traitées. Les résultats sont exprimés en $\Omega.\text{cm}^2$.

6.10 Analyses statistiques

Pour chaque culture, les mesures ont été faites sur 3 à 5 répliques et les résultats présentés sont les moyennes \pm SD obtenues sur minimalement 3 cultures indépendantes. Selon le cas un test t de Student pour échantillons pairés ou non pairés a été appliqué de même que des analyses de variance ANOVA avec un test Dunnett de comparaisons multiples. Le niveau de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

DEUXIEME PARTIE

PRESENTATION DES RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE VII

RÉSULTATS ET DISCUSSION

7.1 Effets du Cd sur la viabilité cellulaire

Afin de déterminer la concentration de traitement des cellules au Cd nous avons utilisé le test de viabilité cellulaire MTT. Les résultats obtenus sont exprimés sur un graphique semi-logarithmique généralement utilisé pour déterminer facilement les valeurs de LC50 ainsi que les plateaux de viabilité cellulaire minimale (mortalité maximale). Les résultats sont analysés selon l'équation suivante :

$$y = y_{\min} + [(y_{\max} - y_{\min}) / (1 + 10^{(LC50 - X)})] \times \text{Hillslope}$$

Où :

y_{\max} : pourcentage de viabilité cellulaire maximale (contrôle)

y_{\min} : pourcentage de viabilité cellulaire minimale (capacité maximale de toxicité du métal)

LC50 : concentration d'exposition létale pour 50% de la population cellulaire

Nous avons obtenu une courbe dose-réponse complète de viabilité cellulaire en réponse au Cd pour chacun des trois protocoles d'exposition. Sachant qu'une exposition de 24 h à une concentration de Cd menant à 5% de mortalité (LC5) est suffisante pour induire une réponse cellulaire (Cardin et al., 2009) et que dans notre étude nous voulions "perturber" les cultures sans toutefois induire trop de mortalité, nous avons ainsi pu déterminer la valeur de la LC5 comme concentration de traitement des cultures.

Les résultats montrent que la viabilité cellulaire diminue de façon graduelle en fonction de l'augmentation de la concentration de Cd dans le milieu d'exposition et prend la forme d'une courbe dose-réponse de type sigmoïde (Figure 7.1).

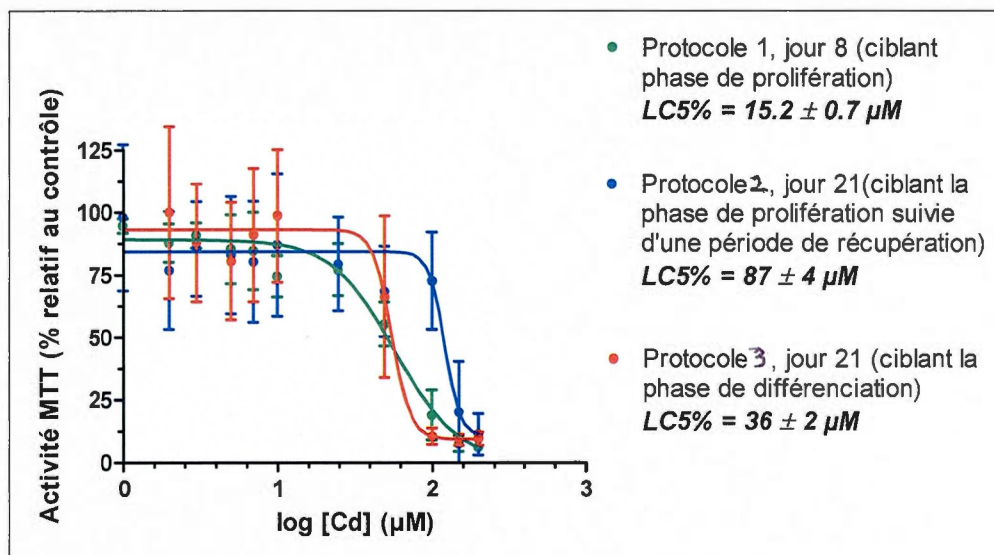


Figure 7.1 Viabilité de cellules Caco-2 cultivées pendant 8 ou 21 jours et exposées à des concentrations croissantes de Cd selon divers protocoles d'exposition. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle (0 µM de Cd). Les valeurs sont les moyennes \pm écarts types de 6 passages indépendants.

On constate que les cellules exposées selon le protocole 2, soit durant la phase de prolifération suivie d'une phase de récupération, tolèrent une concentration de Cd plus importante ($LC5 = 87 \pm 4 \mu M$) que les cellules exposées selon le protocole 1 ($LC5 = 15,2 \pm 0,7 \mu M$) sans période de récupération. Bien que ces deux protocoles ciblent chacun la phase de prolifération et que les cellules aient été exposées pendant cette même période aux mêmes concentrations de Cd, la période de récupération de deux semaines du protocole 2 pourrait expliquer cette forte différence de $LC5$ et donc de tolérance au Cd.

Concernant le protocole 3, on obtient une valeur de $LC5$ intermédiaire de $36 \pm 2 \mu M$ lorsque les cellules sont traitées pendant la phase de différenciation. Le fait que les cellules du protocole 1 exposées pendant une semaine tolèrent moins le Cd que celles du protocole 3 exposées pendant deux semaines, suggère que ce métal affecte plus les cellules en phase proliférative que celles en phase de différenciation. De même, en 2009 Cardin et ses collègues ont montré que la $LC50$, mesurée après exposition de 24 h au Cd, était presque trois fois plus élevée pour les cellules Caco-2 de 21 jours de culture que pour les cellules de 7 jours. Cette étude ainsi que nos résultats montrent que les cellules différenciées sont plus tolérantes que les cellules indifférenciées, mais également que ce

n'est pas tant la durée mais la phase pendant laquelle l'exposition se fait qui est le paramètre déterminant de la tolérance (résistance) au Cd.

Dans nos travaux, nous voulions exposer les cellules au Cd selon le protocole d'exposition qui serait le plus pertinent au profil d'expression de l'enzyme étudiée de façon à pouvoir évaluer plus facilement si le Cd perturbe cette expression. Nous avons alors choisi de travailler avec le protocole 3 qui vise la phase de différenciation et la valeur de LC5 de 36 μ M, étant donné les profils d'expression obtenus selon le temps de culture des quatre enzymes d'intérêt dans les cellules Caco-2 témoins (Figure 7.2).

7.2 Effets du Cd sur le profil d'expression des gènes associés aux quatre enzymes d'intérêt

7.2.1 Profils d'expression des gènes d'intérêt selon le temps de culture dans les cellules Caco-2 non-traitées

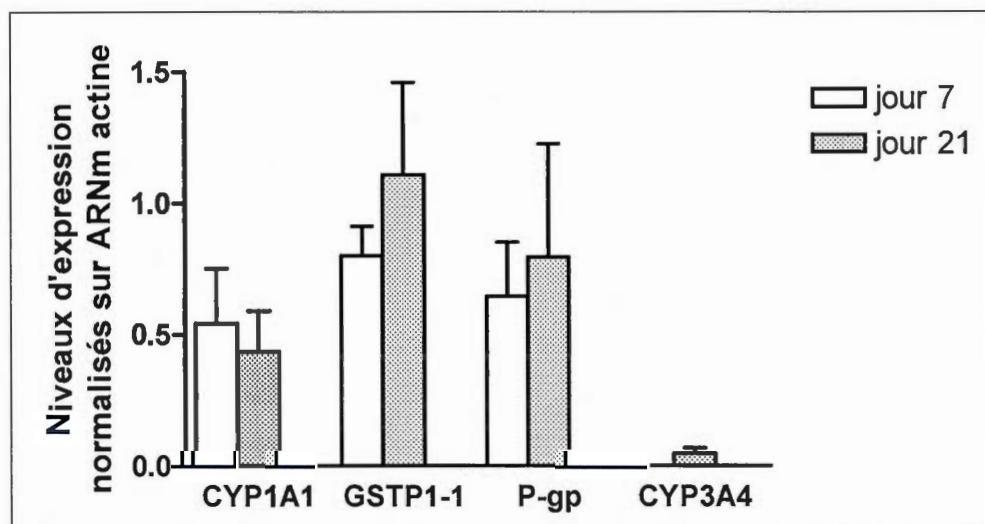


Figure 7.2 Profil d'expression de 3 enzymes de biotransformation et du transporteur membranaire P-gp en fonction du temps de culture des cellules Caco-2. Les cellules ont été cultivées pendant 21 jours en absence de Cd. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 4 à 11 cultures indépendantes.

Les résultats de la figure 7.2 montrent que l'expression de la GSTP1 et de la P-gp augmentent avec le temps de culture tandis que l'expression du CYP1A1 semble quant à elle diminuer. Concernant le CYP3A4, comme mentionné dans la section 4.2.3, son niveau d'expression basal dans la lignée Caco-2 est trop faible pour être appréciable sans stimulation pendant deux semaines post-confluence avec de la $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamine D₃ (Schmiedlin-Ren et al., 1997a; Aiba et al., 2005 ; Xu et al., 2005 ; Hou et al., 2007 ; Fan et al., 2009). Lorsque ce traitement n'a pas été appliqué, nous n'avons pas été capables de détecter de l'ARNm de CYP3A4 au jour 7 mais nous avons tout de même observé une faible expression au jour 21.

Cette analyse nous révèle certes des tendances mais, le test t de Student effectué sur les valeurs moyennes n'a révélé aucune différence significative de niveau d'expression de chaque gène entre le jour 7 et le jour 21 ; cette perte de significativité peut être due à la variabilité des valeurs brutes (ARNm). Cependant, l'objectif ici était d'étudier des variations d'expression en fonctions du temps de culture, ces variations pouvant être malgré tout reproductibles, d'où l'analyse pairée (Figure 7.3).

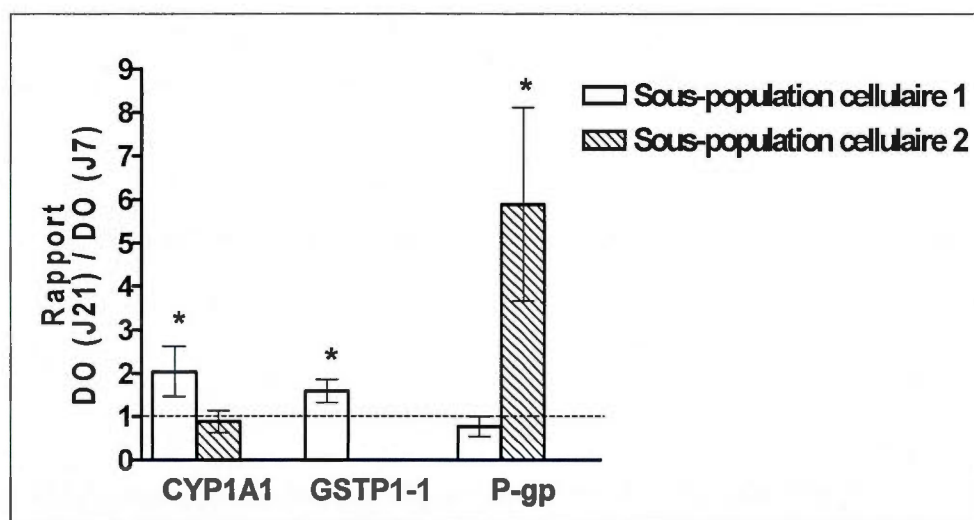


Figure 7.3 Profil d'expression de 2 enzymes de biotransformation et du transporteur membranaire P-gp en fonction du temps de culture des cellules Caco-2. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types des rapports pairés: niveau ARNm J21/ ARNm J7 effectués pour chaque culture et sur 3 à 6 cultures indépendantes. Le niveau d'expression de l'ARNm au jour 7 est arbitrairement fixé à 1. (*) significativement supérieur à 1.

Un test t de Student sur les valeurs paires (J7 et J21) révèle une différence significative de niveau d'expression pour certains gènes selon le temps de culture, ce qui nous permet d'approfondir d'avantage l'analyse de nos observations. En effet, le niveau d'ARNm au jour 7 étant arbitrairement fixé à 1, on constate que le niveau d'expression de la GSTP1 au jour 21 est significativement supérieur à 1 et donc augmente avec le temps de culture, confirmant ce que nous avons observé dans la figure 7.2 ainsi que les résultats de Scharmach et son équipe en 2009. Vecchimi et al (1997) ont aussi constaté que les niveaux de GST α augmentaient avec la différenciation entérocytaire des cellules Caco-2.

Concernant le gène de la P-gp, on constate deux profils d'expression (Figure 7.3) : une où elle augmente significativement avec le temps de culture et une seconde où l'expression demeure stable, ce qui suggère la présence de deux sous-populations de cellules. Le premier profil confirmant le résultat de la figure 7.2 qui suggère aussi une augmentation de l'expression du gène de la P-gp avec le temps de culture, nous pouvons ainsi conclure à une telle variation d'expression de la P-gp, tout comme Seithel et ses collègues l'ont montré en 2006. Néanmoins, ces deux différents profils d'expression peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité de la lignée cellulaire Caco-2. En effet, contrairement à de nombreuses lignées d'origine cancéreuse, elle n'est pas parfaitement homogène en plus de présenter un phénotype instable. Ainsi divers clones ont été isolés à partir de la lignée cellulaire Caco-2, dont les cellules TC7 hautement différenciées (Mahraoui et al., 1994).

Comme mentionné dans la section 4.2.2.1, l'étude de Carrière et al. en 1996 note une diminution d'expression de l'ARNm du CYP1A1 dans deux populations clonales isolées de la lignée Caco-2, TC7 et PF11, dès l'approche de la confluence, donc une chute d'expression en fonction du stade de différenciation. De même, ces auteurs n'ont détecté aucune expression basale d'ARNm de CYP1A1 entre le quatrième et vingtième jour de culture dans les cellules Caco-2 contrôles et seulement une induction par le β -NF (β -naphthaoflavone) qui est un HAP. En effet, on sait que l'expression constitutive du CYP1A1 dans l'intestin humain est faible mais hautement induite par les HAP présents dans la nourriture principalement par le récepteur AhR (aryl hydrocarbon receptor) (Fontana et al., 1999). Le résultat de la figure 7.2, obtenu de 4 à 11 cultures, suggère une diminution de l'expression du gène *cypl1* en fonction du temps de culture comme les

résultats de Carrière et son équipe (1996), mais l'analyse statistique ne révèle aucune différence significative.

Par contre, l'analyse pairée de la figure 7.3 de ces mêmes résultats comparant les niveaux d'expression entre le jour 7 et le jour 21 de chaque culture, indique deux profils d'expression pour le CYP1A1 : un où elle augmente de manière significative avec le temps de culture, et un second où elle reste stable. Tout comme pour le gène codant pour la P-gp, il se détache à nouveau deux sous-populations cellulaires. Le premier profil d'expression de la sous-population cellulaire 1 révèle certes une augmentation d'expression significative au cours de la différenciation, mais ce résultat est contraire à ceux des études citées précédemment. Tout cela souligne qu'il règne encore beaucoup d'incertitudes et que le profil d'expression du CYP1A1 en fonction du temps de culture doit encore faire l'objet d'études.

7.2.2 Profils d'expression des gènes d'intérêt selon différents types de traitement

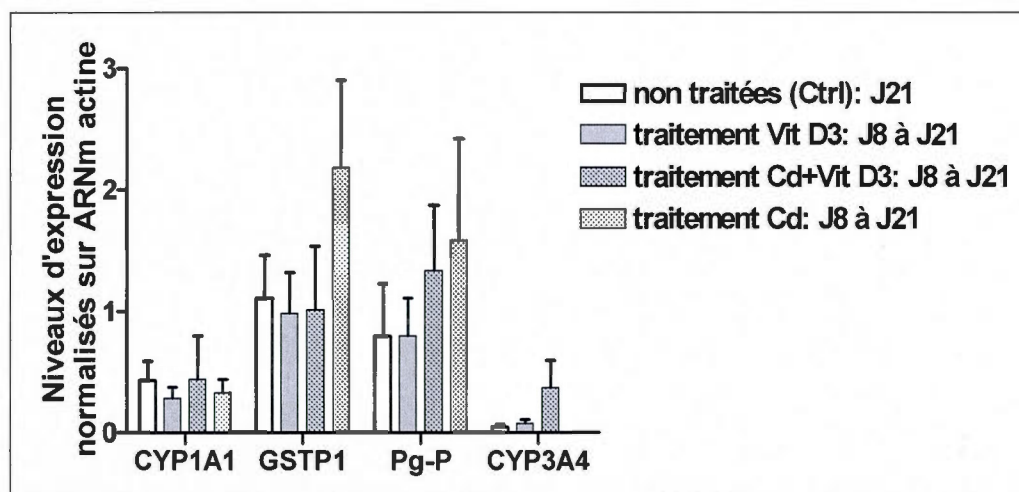


Figure 7.4 Profil d'expression des enzymes d'intérêt en fonction du traitement des cellules Caco-2. Les cellules sont cultivées sur boîte de Pétri en absence (non traitées) ou en présence de 36 μM de Cd ou de 0,5 μM de vitamine D₃ seuls ou en combinaison du J8 au J21. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 3 à 9 passages.

D'après la figure 7.4 et comme on a pu le constater dans la figure 7.2, l'expression basale du CYP3A4 est faible au jour 21 dans les cellules témoins (Ctrl). Bien que la littérature (Schmiedlin-Ren et al., 1997a; Aiba et al., 2005 ; Xu et al., 2005 ; Hou et al., 2007 ; Fan et al., 2009) rapporte qu'un traitement à la vitamine D₃ augmente de façon importante son expression, ici ce niveau ne semble augmenter que légèrement suite à un traitement à la vitamine D₃ et paraît plus faible qu'attendu. Cependant, on constate une expression stimulée suite à un traitement combinant vitamine D₃ et Cd, ce qui est un résultat surprenant. En effet, soit le Cd n'a aucune conséquence sur l'effet stimulateur de la vitamine D₃ (et dans ce cas la stimulation par la vitamine D₃ a été très efficace); soit le Cd stimule l'expression du CYP3A4, ce qui est peu probable étant donné que le traitement au Cd seul n'a pas stimulé l'expression de ce gène. Ainsi les plus grands niveaux d'ARNm de CYP3A4 observés suite à un traitement combinant vitamine D₃ et Cd seraient dus à la présence de vitamine D₃ et non à celle de Cd. Cependant, cela nous permet de constater que le traitement à la vitamine D₃ seul n'a pas donné les résultats escomptés et donc n'a pas réussi à induire l'activité du CYP3A4, autrement les niveaux d'ARNm de CYP3A4 auraient été égaux ou supérieurs à ceux obtenus avec le traitement au Cd et à la vitamine D₃.

Aussi, on peut remarquer que le traitement à la vitamine D₃ n'a pas influencé l'expression du CYP1A1, de la GSTP1 et ni celle de la P-gp. Toutefois, le traitement au Cd semble stimuler l'expression de la GSTP1 et il a été montré que le Cd induisait une augmentation des niveaux d'ARNm de la GSTYα (Elbekai et El-Kadi, 2004; 2005). Ce métal semble aussi stimuler celle de la P-gp tout comme indiquent les travaux de Huynh-Delorme et ses collègues (2005) qui ont observé une augmentation dose-dépendante de son expression par un traitement au Cd dans le clone TC7 de la lignée Caco-2. Comme: (1) le Cd favorise le stress oxydatif dans des cultures de cellules humaines (Stohs et Bagchi, 1995 ; Nieboer et Fletcher, 1996 ; Bagchi, 2000), notamment en réduisant l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (Shaikh et al., 1999) et la catalase (Hussain et al., 1987), (2) l'expression de la P-gp est sensible à ce type de stress et qu'elle est souvent surexprimée en présence de substrats cationiques (comme le Cd²⁺) et (3) un stress chimique causé par des électrophiles influence l'induction de la GST (Hayes et al., 1995), il est possible que l'augmentation du niveau d'expression des ARNm de la P-gp et de la GST en présence de Cd soit due à la mise en

place de mécanismes de défense pour faciliter l'excrétion de Cd. Le traitement au Cd seul ne semble pas avoir d'effet sur l'expression du CYP1A1, mais potentialise l'induction du CYP1A1 par des ligands à AhR (Elbekai et El-Kadi, 2004; 2005).

Le traitement combinant le Cd et la vitamine D₃ semble avoir un effet stimulateur sur l'expression de la P-gp moins important que le Cd seul et ne stimule pas l'expression de la GSTP1. Ainsi, il est possible que la vitamine D₃ diminue l'effet stimulateur du Cd sur les niveaux d'ARNm de la GSTP1 et de la P-gp.

En effet, en 1993, Helen Wiseman montre que la vitamine D₃ détient un pouvoir antioxydant permettant de protéger les membranes cellulaires contre la peroxydation des lipides causée par les radicaux libres. Cette aptitude antioxydante de la vitamine D₃ a été étudiée sur la base de son étroite apparentée moléculaire avec le cholestérol duquel elle dérive. La vitamine D₃ protège la membrane contre l'oxydation en se faisant oxyder par les ROS à la place des acides gras membranaires. En effet, ses anneaux hydrophobes (Figure 7.5) lui permettent de stabiliser, de protéger la membrane en interagissant avec les résidus saturés, monoinsaturés et polyinsaturés des chaînes d'acides gras des phospholipides membranaires ; ceci a pour effet de diminuer la fluidité de la membrane cellulaire comme il a déjà été démontré avec le cholestérol (Wiseman et al., 1991 ; 1992).

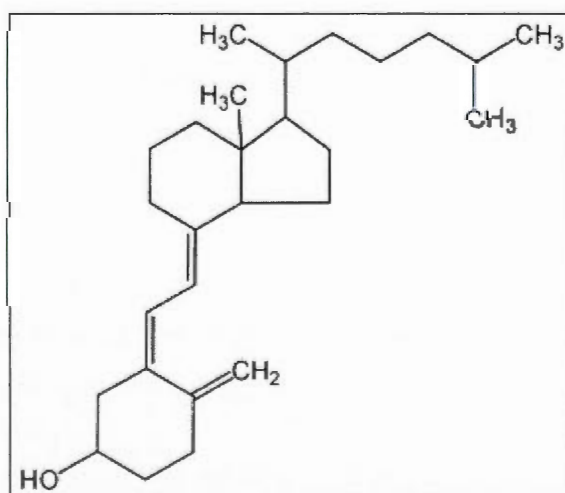


Figure 7.5 Structure chimique de la vitamine D₃ (1 α ,25-dihydroxy vitamine D₃) d'après : "Nomenclature of Vitamin D". Recommendations 1981. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN).

De plus, la vitamine D₃ est connue pour réduire l'apparition de cancers du colon, du cerveau et de la prostate chez l'humain (Garland et Garland, 1980 ; Hanchette et Schwartz, 1992) grâce à son effet antiprolifératif. Elle se lie à son récepteur nucléaire VDR (vitamin D receptor) formant ainsi un complexe ; ce dernier forme un facteur de transcription reconnu par les éléments de réponse VRDEs (vitamin D response elements) des promoteurs de plusieurs gènes cibles contrôlant la prolifération des cellules. Ainsi, la vitamine D₃ régule l'expression de nombreux gènes de façon à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses (Krishnan et al., 2003).

D'autres études ont montré que la vitamine D₃ induit également l'expression de plusieurs gènes contrôlant l'équilibre rédox dans de nombreux types cellulaires, comme ceux codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et la glutathion peroxydase (GPx) dans des cellules de peau humaine (Lin et al., 2002). Elle réduit le stress oxydatif en favorisant la production de GSH, de GPx et de superoxyde dismutase (SOD) dans les astrocytes (Garcion et al., 1999) et les hépatocytes de rats (Sardar et al., 1996), ces enzymes permettant de lutter contre les radicaux libres qui, s'ils sont présents en trop grand nombre, peuvent aussi endommager l'ADN (Peehl et al., 2004). Tous ces résultats suggèrent que la vitamine D₃ est capable de prévenir le développement de cancers également en protégeant les cellules d'un stress oxydatif.

En résumé, la vitamine D₃ exerce son aptitude antioxydante sur deux compartiments : la membrane cellulaire et le cytosol. Sur le premier, elle se fait directement oxyder par les ROS alors que dans le second, elle favorise la production d'un plus grand stock d'antioxydants cytosoliques comme le GSH qui subira l'oxydation et, la GPx et la SOD qui dégraderont les ROS. Son mode d'action membranaire est direct et son mode d'action antioxydante cytosolique indirect. La vitamine D₃ détient un pouvoir d'antioxydant global sur l'ensemble de la cellule.

La G6PDH est la première enzyme de la voie des pentoses phosphates qui constitue une voie importante du métabolisme énergétique et joue un rôle essentiel dans la production de molécules de NADPH utilisées lors de la synthèse des acides gras, du cholestérol et pour réduire le GSH. L'oxydation du glucose-6-phosphate (G6P) en 6-phosphoglucuno- δ -lactone, catalysée par la G6PDH est l'étape limitante de la voie des

pentoses phosphates (Figure 7.6). Cette réaction est couplée à la réduction d'une molécule de NADP^+ en NADPH, ce dernier représentant une source importante de cofacteur essentiel pour de très nombreuses enzymes dont la glutathion réductase, cette dernière enzyme réduisant le glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). Le GSH produit est essentiel au maintien de l'état redox de la cellule et à la lutte contre le stress oxydatif. Ainsi, il est important qu'il règne un stock suffisant de G6PDH qui est à la base de la production d'antioxydants importants tels que le NADPH et le GSH car le Cd accumulé dans le cytosol favorise un stress oxydatif (Stohs et Bagchi, 1995 ; Nieboer et Fletcher, 1996 ; Bagchi, 2000).

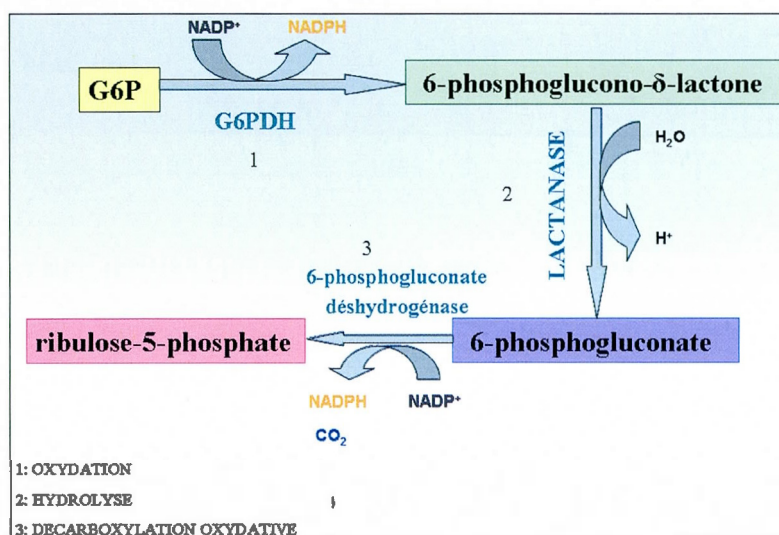


Figure 7.6 Schéma résumant la phase oxydative de la voie des pentoses phosphates dans laquelle intervient la G6PDH.

En 2008, Bao et ses collègues ont montré que la vitamine D_3 pouvait protéger les cellules épithéliales humaines prostatiques saines, mais pas les cellules malignes, contre les dommages causés par un stress oxydatif. En effet, ils ont observé une augmentation de l'activité de la G6PDH à la suite d'un prétraitement à la vitamine D_3 ainsi qu'une augmentation des niveaux de GSH seulement dans les cellules saines, alors que dans les cellules malignes ils n'ont constaté qu'une faible induction d'expression et d'activité de la G6PDH sans augmentation de GSH. Ainsi ils suggèrent que la vitamine D_3 possède une plus faible action antioxydante dans les cellules cancéreuses comparativement aux cellules saines. Ils expliquent que l'élément de réponse DR3 (direct repeat-3 vitamin D

response element) situé sur le premier intron du gène de la G6PDH peut former une liaison avec le VDR et réguler son expression. L'augmentation de l'activité de la G6PDH et du taux de GSH par la vitamine D₃ permet d'éliminer d'avantage les ROS et donc de protéger la cellule.

Ceci nous a mené à tester l'hypothèse que la vitamine D₃ préviendrait l'effet stimulateur du Cd sur l'expression de la GSTP1 et de la P-gp par son pouvoir antioxydant. Pour cela, nous avons traité par la suite les cellules Caco-2 avec un autre antioxydant, la N-acétylcystéine (NAC), afin de vérifier si nous aurions le même effet.

7.3 Vitamine et NAC : un même effet préventif contre le Cd ?

Le corps produit l'acide aminé cystéine qui peut être acétylé en NAC et entre dans la composition du GSH. Son groupement thiol lui confère son aptitude antioxydante en lui permettant de se faire oxyder par les radicaux libres. Contrairement à celui de la vitamine D₃, le mode d'action antioxydante de la NAC au niveau du compartiment cytosolique est direct étant donné que la NAC complexifie directement les radicaux libres par son groupement thiol. Dans la finalité, la NAC et la vitamine D₃ diminuent l'exposition de la cellule aux radicaux libres qui sont potentiellement toxiques. Nous avons donc testé si un traitement avec la NAC sur la même période de temps aurait le même résultat préventif que la vitamine D₃ sur la stimulation de l'expression de la GSTP1 et de la P-gp par le Cd.

La figure 7.7 montre que, tout comme la vitamine D₃, le traitement à la NAC n'a pas influencé l'expression basale de la GSTP1, ni celle de la P-gp. Le traitement combinant la NAC et le Cd ne stimule pas non plus l'expression de la GSTP1 comme nous avons pu le constater avec le traitement combinant le Cd et vitamine D₃; la NAC prévient l'effet stimulateur du Cd. Cet effet est aussi total pour la P-gp ce qui n'était pas le cas de la vitamine D₃. Étonnamment, la présence combinée de NAC et de Cd diminue l'expression basale même si la NAC seule n'a pas cet effet. Ainsi, la NAC semble également avoir le même effet que la vitamine D₃, et même diminuer de façon plus importante l'effet stimulateur du Cd sur les niveaux d'ARNm de la P-gp. Étant donné que la concentration de NAC utilisée est 1000 fois supérieure à celle de la vitamine D₃, on ne

peut pas suggérer que la NAC a un pouvoir antioxydant plus important. Néanmoins, son mode d'action serait beaucoup plus direct au niveau du cytosol par rapport à celui de la vitamine D₃. Aussi, il a été montré que la NAC pouvait également agir autrement que comme antioxydant et modifier certaines voies de signalisation, probablement en interagissant avec des thiols fonctionnels (Sun, 2010).

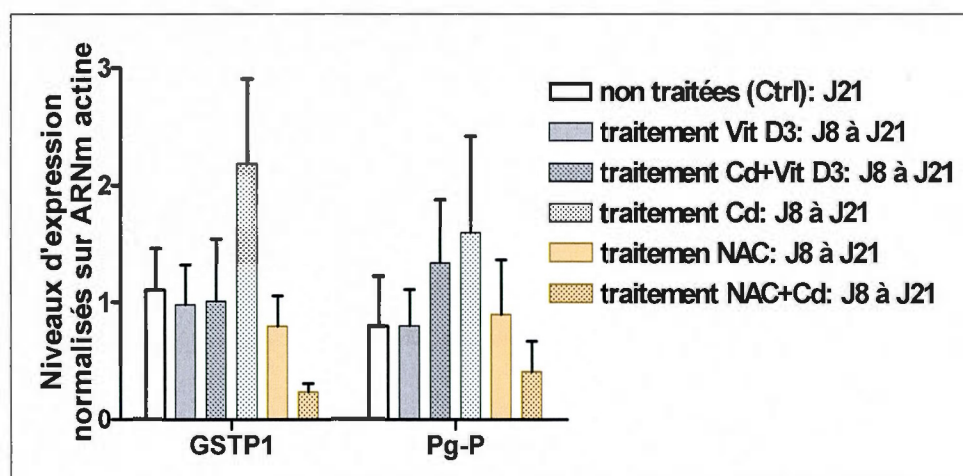


Figure 7.7 Profil d'expression de la GSTP1 et de la Pg-p en fonction du traitement des cellules Caco-2. Les cellules sont cultivées sur boîte de Pétri en absence (non traitées) ou en présence de 36 μM de Cd, de 0,5 μM de vitamine D₃ ou de 500 μM de NAC seuls ou en combinaison du J8 au J21. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 3 à 9 passages.

7.4 Accumulation cellulaire du Cd

Nous avons voulu évaluer la quantité de Cd total qui s'est accumulée dans les cellules Caco-2 après deux semaines d'exposition post-confluence pour mieux analyser les résultats obtenus avec la vitamine D₃ et la NAC. En effet, si la vitamine D₃ ou la NAC modifie l'accumulation cellulaire de Cd (notamment par complexation, empêchant son entrée dans la cellule au niveau des transporteurs transmembranaires), on ne peut plus attribuer les effets observés à une propriété antioxydante mais plutôt à une diminution de l'accumulation intracellulaire de Cd. Or, la figure 7.8 montre que ce n'est pas le cas car on remarque une accumulation constante de 4 à 5 ηmol de $^{109}\text{Cd}/\text{mg}$ de protéines cellulaires, quelque soit le type de traitement. De ce fait, la stimulation moins importante d'expression de la Pg-p et de la GSTP1 observée en présence de Cd et de vitamine D₃ par

rapport à un traitement au Cd seul (Figure 7.4), ne peut être attribuée à une plus faible quantité de Cd intracellulaire accumulé, mais plutôt à une action intracellulaire de la vitamine D₃, cette dernière maintenant l'équilibre rédox par son pouvoir antioxydant. En effet, le Cd induit un déséquilibre rédox qui stimule l'expression de gènes cibles (P-gp et GSTP1), tandis que la vitamine D₃ diminuerait ce déséquilibre par son pouvoir antioxydant et donc diminuerait la stimulation de la transcription de ces gènes. On peut donc en conclure que l'effet du Cd est médié par un déséquilibre rédox.

Sachant qu'un volume cellulaire de $3,66 \pm 0,2$ $\mu\text{l}/\text{mg}$ de protéines a été établi pour les cellules Caco-2 (Blais et al., 1987), l'accumulation constante de 4 à 5 nmol de $^{109}\text{Cd}/\text{mg}$ de protéines cellulaires observée équivaut donc à une concentration intracellulaire de Cd de 1 à 1,5 mM. Cette mesure a été capitale pour les études d'inhibition du Cd sur l'activité de la phosphatase alcaline (section 7.7) et sur l'activité totale de la GST (section 7.6).

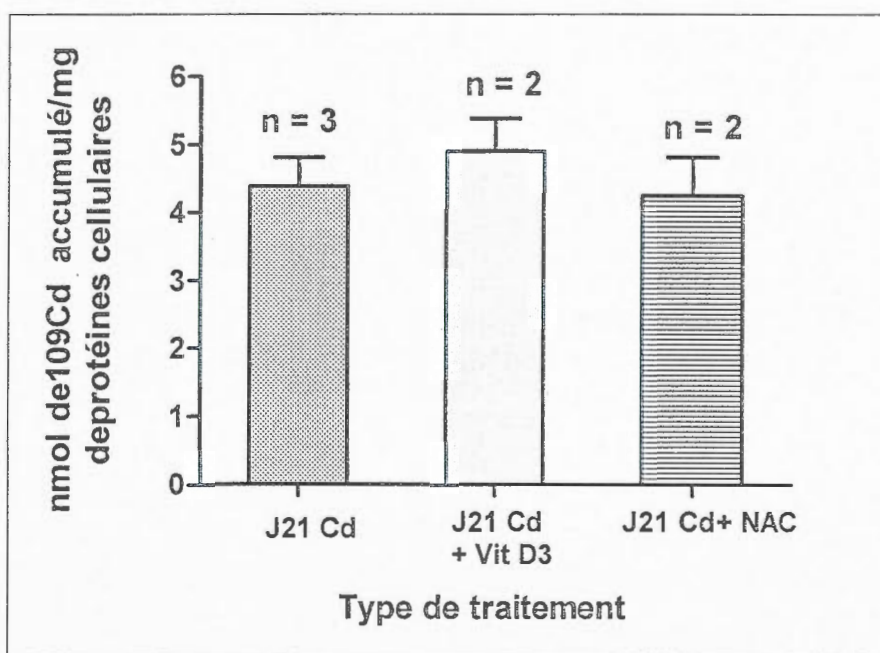


Figure 7.8 Accumulation intracellulaire de Cd selon le type de traitement. Les cellules ont été exposées à $0,5 \mu\text{M}$ de ^{109}Cd du jour 8 au jour 21. Les résultats représentent les moyennes \pm écarts types obtenues sur 2 à 3 cultures indépendantes (5 réplicas chacune).

7.5 Effets du Cd sur l'activité du CYP1A1

Comme il n'y a pas nécessairement de relation quantitative entre la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle, nous voulions aussi mesurer l'activité de l'enzyme associée au CYP1A1, ceci afin de savoir si le Cd pouvait la perturber par action au niveau post-transcriptionnel. Afin de corrélérer des niveaux d'activité de CYP1A1 à des niveaux d'expression d'ARNm, des fractions microsomales de cellules ont été préparées selon deux méthodes décrites dans la section 6.6 pour en mesurer l'activité EROD. En effet, lors de nos premiers essais de mesure sur des échantillons préparés selon le premier protocole d'extraction, nous n'avons pas été capables de mesurer une activité. Pour nous assurer de ce résultat, nous avons voulu vérifier que le protocole mis en place était correct et l'avons alors testé sur un extrait microsomal hépatique de rats vendu commercialement. Pour être également sûr d'éviter la saturation par manque de disponibilité en NADPH, nous avons utilisé un second protocole faisant intervenir le système G6P/G6PDH, ce dernier permettant de régénérer du NADPH, cofacteur important de la réaction. Utilisant les microsomes de rats, nous avons alors constaté que les deux protocoles fonctionnent mais que la réaction utilisant la régénération de NADPH sature moins rapidement (Figure 7.9).

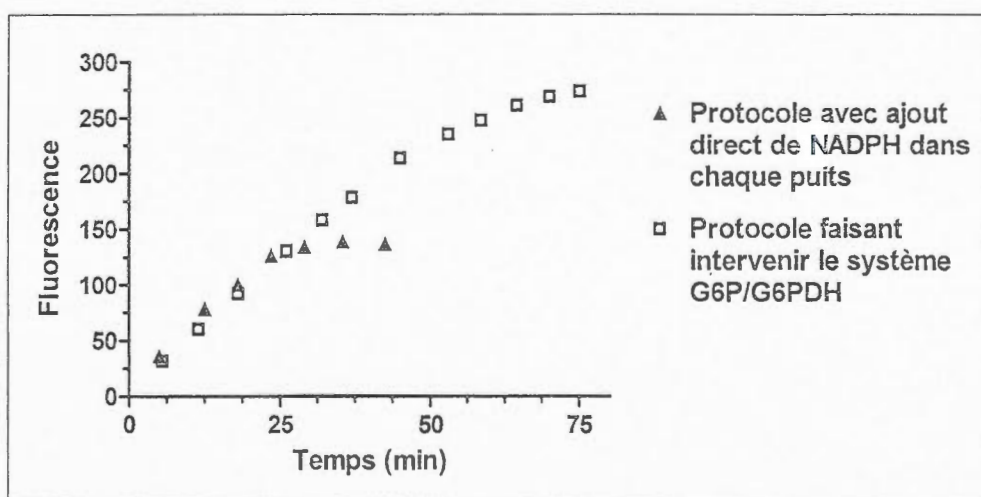


Figure 7.9 Mesure de l'activité EROD en suivant la dééthylation de l'éthoxyrésorufine en résorufine fluorescente (λ excitation: 563 nm; λ émission: 582 nm) en fonction du temps d'incubation en présence de NADPH ajouté seul au milieu de réaction ou en présence d'un système de régénération de NADP en NADPH à l'aide du système G6P/G6PDH.

Nous avons donc effectué les mesures avec ce système de régénération sur les deux types de préparation d'extraits microsomaux d'échantillons de cellules Caco-2 (J7 et J21 Ctrl et J21 Cd) et nous n'avons toujours pas mesuré d'activité EROD. Nous pouvons alors émettre deux hypothèses :

- ✓ Soit nous n'avons pas réussi à extraire les microsomes de la lignée cellulaire et dans ce cas le problème pourrait survenir de nos deux protocoles d'extraction. En effet, nous nous sommes rendus compte dernièrement que, contrairement à ce que stipulait l'article de Carrière et al de 1998, nous avons omis de rajouter dans le tampon de resuspension du surnageant final les mêmes inhibiteurs de protéases utilisés dans le tampon d'homogénéisation pour prévenir la dégradation des enzymes microsomaux par des protéases lors de la décongélation lente sur glace avant de mesurer l'activité EROD. Dans ce cas, il est fort probable qu'une importante portion ait été dégradée lors du dégel des échantillons.
- ✓ Soit nous avons bien extrait les microsomes mais l'activité est très faible. En effet, une étude a montré des niveaux basaux faibles d'ARNm de CYP1A1 et aucune activité EROD dans des cellules Caco-2 contrôles après 8 jours de culture, mais qu'un traitement de 24 h à la dioxine (TCDD) induisait l'expression de l'ARNm et augmentait de façon importante l'activité EROD (49 à 50 pmol/min/mg de protéines) (Sergent et al., 2009a, 2009b). En 1998, Carrière et al. n'ont détecté aucune expression basale d'ARNm de CYP1A1 entre le jour 4 et le jour 20 de culture des cellules TC7, mais une expression d'ARNm induite par un traitement au β -NF corrélée avec une faible activité EROD (~ 32 pmole/min/mg de protéines microsomaux) au neuvième jour de culture. Cela suggère que l'activité EROD de base est bien trop faible pour être détectable dans les cellules contrôles, ce que nos résultats montrent aussi.

On sait que les niveaux d'expression d'ARNm ne sont pas forcément corrélés avec les niveaux protéiques correspondants. Cependant, ayant été capables de détecter un niveau basal d'ARNm de CYP1A1 dans des cellules contrôles (Figure 7.3) ainsi que dans des cellules traitées au Cd (Figure 7.4), on aurait pu s'attendre à mesurer au moins une très faible activité, ce qui n'a pas été le cas. En fait, nous avons détecté une activité

extrêmement faible d'environ 0,290 pmol/min/mg de protéines microsomales dans les cellules contrôles de 21 jours, et sensiblement la même dans les cellules traitées au Cd, soit presque 100 fois moins que ce que rapporte l'article de Carrière et al. de 1998. En 2005, Elbekai et El-Kadi ont montré que la présence de Cd stimule la production de GSH intracellulaire et qu'une déplétion en GSH cellulaire par un traitement au BSO (buthionine-(S, R)-sulfoximine) entraîne une augmentation d'ARNm de CYP1A1 mais une diminution de l'activité EROD. En effet, cette réduction d'activité du CYP1A1 durant ce stress oxydatif provoqué serait probablement due à une réponse adaptative des cellules pour minimiser leur dommage, l'activité EROD étant capable de générer des métabolites toxiques bioactifs comme divers ROS, aggravant ainsi le stress oxydatif initialement présent. Aussi plusieurs études (Elbekai et El Kadi, 2004; 2007) ont révélé que le Cd stimulait l'expression d'ARNm du CYP1A1 et potentialisait l'augmentation d'ARNm par des ligands AhR, mais qu'il inhibait l'activité EROD induite par ces mêmes ligands. Ces résultats peuvent expliquer le fait que nous n'avons également pas détecté d'activité EROD dans les cellules traitées au Cd (admettant que nos préparations microsomales étaient de bonne qualité). Comme Elbekai et El-Kadi (2004 ; 2007), il aurait été intéressant de tester l'effet d'un traitement des cellules avec un HAP et d'un co-traitement avec un HAP et du Cd.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette inhibition d'activité par le Cd. Par exemple en 2001, Bogdan suggéra que l'augmentation de la production de ROS favorisée par la présence de Cd pourrait être responsable de l'oxydation des groupements thiols des résidus cystéines de l'enzyme. Il a également été proposé que le métal se lierait directement à la protéine (Spink et al., 2002).

Lorsque nous avons effectué les premières extractions de microsomes selon le premier protocole, nous avons à peine obtenu 0,015 mg/ml, soit dix fois moins que 0,1 à 0,5 mg/ml conseillé pour la mesure (Carrière et al., 1998). Nous avons donc dû cultiver plus de cellules dans le but de concentrer davantage de microsomes dans le culot obtenu après l'ultracentrifugation à 100 000 g. Cependant, en fonctionnant selon le second protocole d'extraction des microsomes, nous avons obtenu entre 0,94 et 5 mg/ml, ce qui est plutôt élevé étant donné le contenu respectif en protéines de 5 et 9 mg/ml dans l'homogénat initial. Néanmoins, on peut alors se demander à quoi correspondent les

concentrations en protéines mesurées. En effet, le culot obtenu pourrait se composer de restes de protéines cytosoliques et/ou membranaires et seule une faible fraction microsomale composerait l'échantillon, ce qui signifie de très faibles enrichissements qui expliqueraient la très faible activité EROD mesurée (100 fois moins qu'attendu).

Par ailleurs, nous avons obtenu une courbe standard en ajoutant des quantités croissantes connues de résorufine par puits. Cependant, nous avons remarqué que la pente obtenue n'était pas constante mais diminuait avec le temps d'incubation à 37°C (Figure 7. 10). Or, la mesure d'activité EROD demande un temps d'incubation de 10 à 15 min. Ainsi, il est important de mentionner qu'il nous a fallu être vigilants pour utiliser la courbe étalon correspondant au même temps d'incubation que celui de l'échantillon.

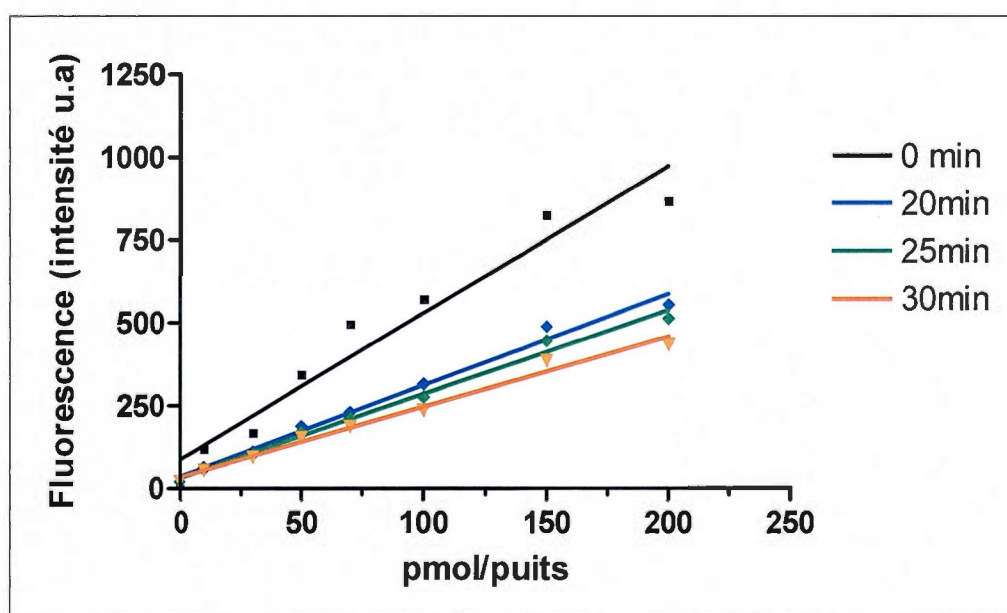


Figure 7. 10 Courbes standards de résorufine utilisées pour calibrer l'activité EROD des échantillons cellulaires. Des quantités croissantes connues de résorufine ont été diluées dans du tampon phosphate. Les mesures ont été effectuées à 37°C et à différents temps d'incubation. Les longueurs d'onde (λ) d'excitation et d'émission optimales sont respectivement 563 nm et 582 nm.

7.6 Effets du Cd sur l'activité des GST

7.6.1 Caractérisation de l'activité de la GST des cellules Caco-2 selon le temps de culture

Nous avons voulu savoir si l'augmentation d'expression de l'ARNm de la GSTP1 observée en fonction du temps de culture à la figure 7.3, se reflétait aussi par une augmentation de l'activité étant donné que les niveaux d'ARNm ne sont pas toujours corrélés aux niveaux d'activité. Les résultats que nous avons obtenus (Figure 7.11) montrent que l'activité de la GST augmente avec le temps de culture dans les cellules Caco-2 contrôles mais qu'elle est de 14 à 67 fois moins élevée qu'attendu (564 à 5391 $\eta\text{mol/min/mg}$ (Peters et Roelofs 1989)), cette dernière étant comprise entre 40 et 80 $\eta\text{mol/min/mg}$.

En effet, une étude montre que l'activité totale de la GST est élevée dans les cellules Caco-2 après confluence, notamment lorsque la prolifération cellulaire est fortement réduite et que les cellules sont structuralement et fonctionnellement bien différenciées (Savini et al., 1995). En 1989, Peters et Roelofs montrent que dans ces mêmes cellules, l'activité spécifique totale de la GST est faible jusqu'à la confluence mais qu'elle augmente de façon importante entre le jour 4 et le jour 16 post-confluence, puis se maintient à un niveau maximal jusqu'au trente deuxième jour post-confluence. Ces auteurs ont également constaté que lorsque cette lignée est cultivée sur une longue période de temps (20 jours ou plus), l'isoforme α représente alors 90 % de la GST totale exprimée. Du jour 0 au jour 32 après la confluence, ils ont mesuré une activité croissante de 564 à 5391 $\eta\text{mol/min/mg}$ de protéine. Ainsi, l'expression de la GST est supérieure dans les cellules Caco-2 différenciées. Enfin, en 1998, Beaumont et son équipe ont aussi mesuré une activité GST basale élevée de 412 $\eta\text{mol/min/mg}$ de protéines mais ne précisent pas le stade de confluence des cultures. Ainsi, nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature quant à l'augmentation de l'activité de la GST avec le temps de culture mais les valeurs sont cependant plus faibles.

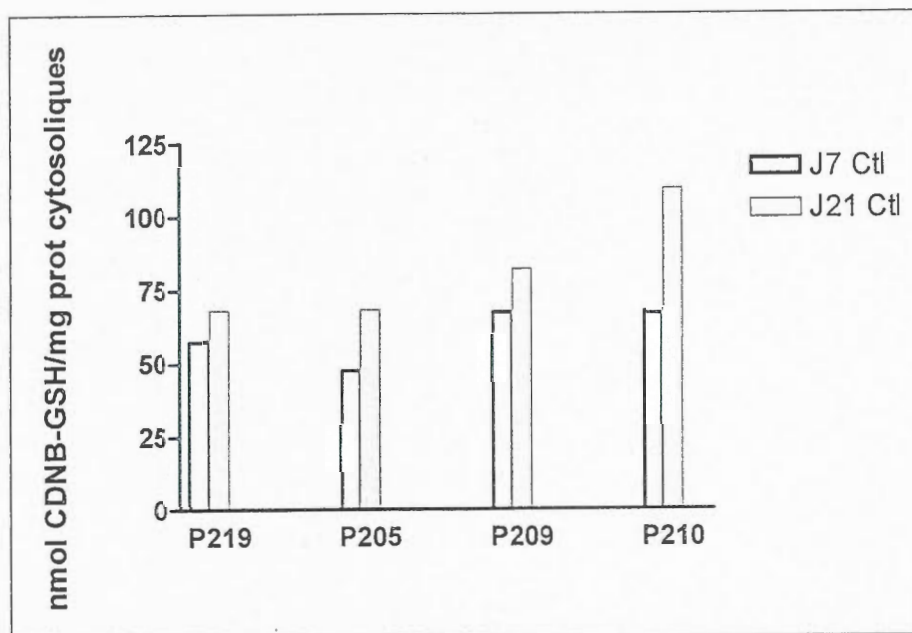


Figure 7.11 Mesure de l'activité de la GST selon le temps de culture à l'aide du CDNB utilisé comme substrat. La mesure s'effectue sur 4 passages indépendants témoins : P219, P205, P209 et P210 au J7 et au J21 de culture. Elle est réalisée à 340 nm et 25°C pendant 5 min au spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en nmol de CDNB-GSH/mg de protéines cytosoliques.

7.6.2 Effet du Cd sur l'activité de la GST

Comme précédemment, nous avons voulu savoir si la stimulation d'expression de l'ARNm de la GSTP1 observée dans des cellules traitées au Cd (Figure 7.4) se reflétait aussi par une augmentation de l'activité de la GST. Nos résultats montrent deux réponses selon les passages cellulaires (Figure 7.12) qui peuvent notamment s'expliquer par l'hétérogénéité de la lignée cellulaire Caco-2. La première réponse reflète un léger effet stimulateur du Cd sur l'activité de la GST pour les passages P209 et P205. En effet il a été montré que le Cd induisait une augmentation des niveaux d'ARNm de la GSTY α (Elbekai et El-Kadi, 2004; 2005) et stimulait légèrement son activité (Tjalkens et al., 1998 a). Par ailleurs, la deuxième réponse suggère une faible inhibition de l'enzyme observée sur les homogénats de cellules traitées au Cd pour les passages P219 et P210 qui peut être due à : (1) un effet du Cd sur l'expression de la GST ou (2) un effet direct du Cd accumulé sur la protéine.

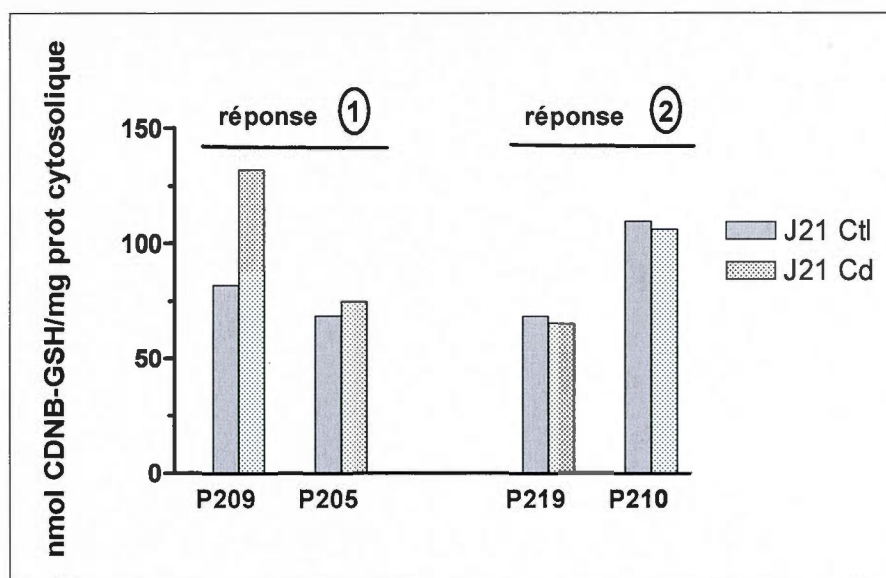


Figure 7.12 Comparaison de l'activité de la GST entre des cellules contrôles et des cellules traitées au Cd du J8 au J21. Les résultats ont été obtenus sur 4 cultures indépendantes au J7 et au J21.

Afin de distinguer ces deux possibilités, nous avons effectué des mesures sur des homogénats contrôles en ajoutant du Cd dans la cuvette lors de la mesure d'activité. En effet, connaissant la concentration moyenne de Cd intracellulaire accumulé lorsque les cellules sont exposées pendant 2 semaines à 1 - 1.5 mM de Cd (section 7.4), on a pu établir une gamme de concentrations de Cd du même ordre de grandeur à ajouter dans la cuvette de dosage. Nous avons donc choisi d'ajouter 1, 3, 5, 10 et 15 mM de Cd dans la cuvette de réaction sur des échantillons contrôles de 21 jours au moment de la lecture. Cette addition de concentrations graduelles de Cd a pour but de savoir si le métal, présent dans les homogénats de cellules exposées pendant 2 semaines, pourrait avoir un effet inhibiteur sur l'enzyme en se liant directement sur des thiols fonctionnels. On constate que 1 mM et 5 mM de Cd inhibent respectivement d'environ 88 % et 71% l'activité de la GST (Figure 7.13). Ceci est un résultat surprenant difficile à expliquer car on se serait plutôt attendu à un effet inhibiteur croissant en fonction de concentrations croissantes de Cd. Toutefois, le Cd inhibe la réaction enzymatique qui catalyse la conjugaison du CDNB avec le GSH, possiblement en compétitionnant avec le CDNB pour sa liaison au GSH. En se complexant au GSH, le Cd le rendrait moins disponible ce qui limiterait la conjugaison entre le GSH et le CDNB. Par ailleurs, indépendamment de diminuer la vitesse de la

réaction par manque de cofacteur (GSH), le Cd pourrait aussi se lier à des groupements thiols fonctionnels de la GST.

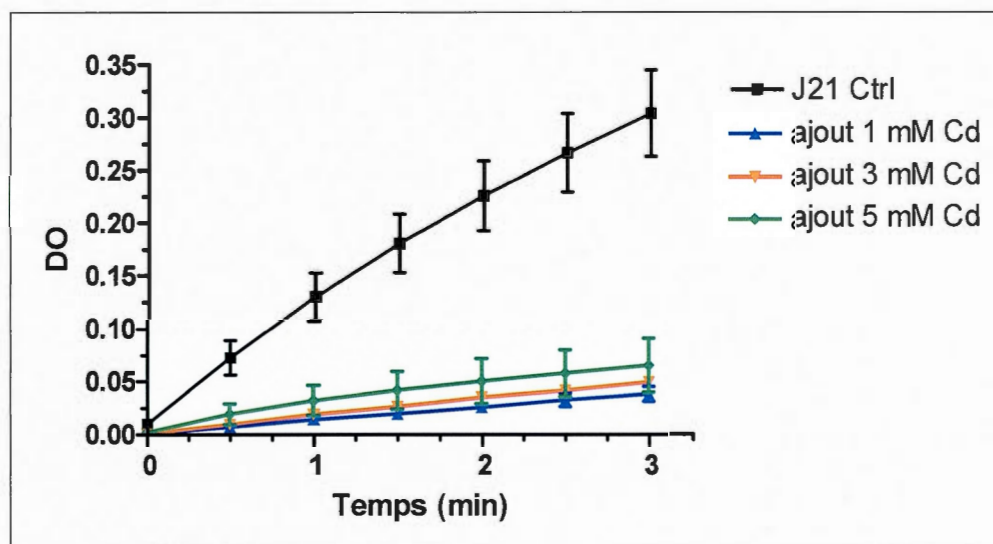


Figure 7.13 Cinétique d'activité GST mesurée par conjugaison du CDNB avec le GSH. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de deux cultures indépendantes.

7.7 Effets du Cd sur la différenciation cellulaire

Étant donné que la phosphatase alcaline est un marqueur de différenciation des cellules Caco-2, les résultats obtenus sur des cellules non exposées et sur des cellules exposées au Cd, une fois comparés à ceux obtenus pour l'expression des enzymes de biotransformation, nous permettront de conclure si l'effet du Cd est spécifique à certaines enzymes ou s'il affecte de façon globale le processus de différenciation.

7.7.1 Caractérisation de l'activité de la phosphatase alcaline des cellules Caco-2 selon le temps de culture

On peut remarquer que l'activité spécifique de la phosphatase alcaline augmente de manière significative selon le temps de culture et donc l'état de différenciation des cellules Caco-2 (Figure 7. 14). Par rapport au J7, l'activité au J14 est 1,7 fois plus élevée tandis que celle du J21 est 3,2 fois plus élevée. Ainsi, l'activité semble doubler chaque

semaine. On remarque que l'activité au J21 est bien plus importante comparativement au J14, les cellules étant encore peu différenciées par rapport à celles du J21. Plus les cellules sont différenciées, plus l'activité de l'enzyme est importante.

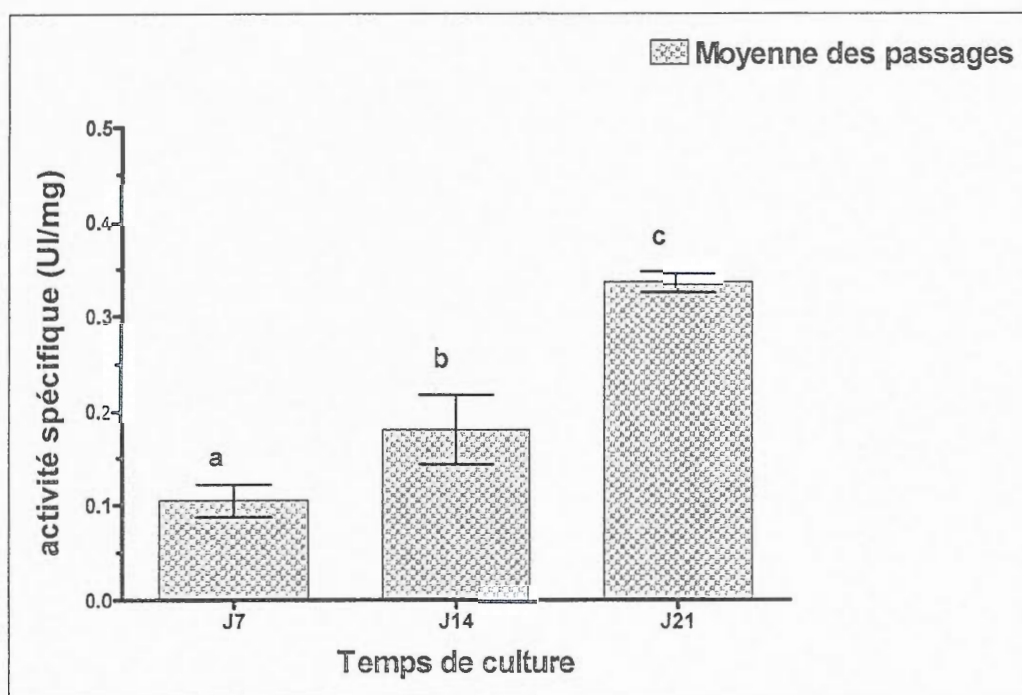


Figure 7.14 Mesure de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline selon le temps de cultures dans les cellules Caco-2 contrôles. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 4 à 10 cultures indépendantes. Les résultats aux lettres différentes sont significativement différents les uns des autres (ANOVA).

7.7.2 Effets de divers traitements des cellules Caco-2 sur l'activité de la phosphatase alcaline

Au J14 comme au J21, les mêmes tendances sont observées quant à une inhibition dans les cellules traitées au Cd alors que le traitement à la vitamine D₃ est sans effet (Figure 7.15). Néanmoins le test ANOVA ne révèle aucun effet significatif au J14, tandis qu'au J21 une inhibition significative de 75% est observée dans les échantillons traités au Cd avec ou sans vitamine D₃. Une semaine de traitement en présence de Cd ne semble donc pas suffire à inhiber l'activité de la phosphatase alcaline qui, comme évoqué dans la section précédente, demeure encore très faiblement exprimée dans les cellules peu différenciées.

Afin de mieux comprendre l'effet inhibiteur du Cd sur l'activité de la phosphatase alcaline, des mesures ont aussi été faites sur des échantillons contrôles de 21 jours auxquels des concentrations croissantes de Cd ont été ajoutées dans la cuvette de réaction au moment de la lecture.

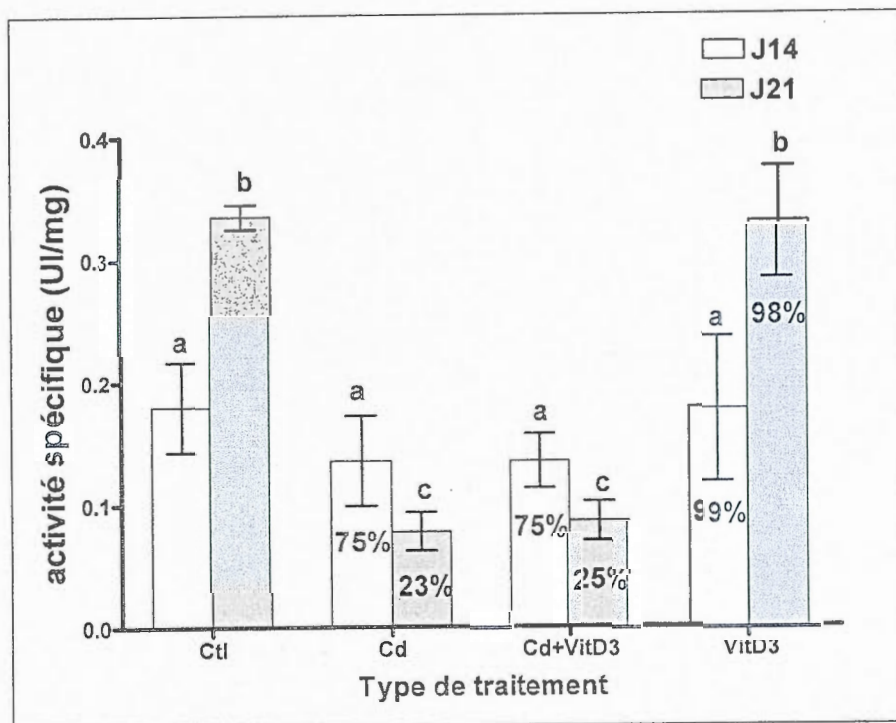


Figure 7.15 Mesure de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline selon le type de traitement des cellules Caco-2 de 14 ou 21 jours de culture. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 4 à 10 cultures indépendantes. Les résultats aux lettres différentes sont significativement différents les uns des autres (ANOVA).

7.7.3 Effet inhibiteur du Cd sur l'activité de la phosphatase alcaline

De la même façon que nous avons testé l'effet du Cd ajouté en cuvette sur l'activité de la GST à la section 7.6.2, nous avons effectué des mesures sur des homogénats contrôles de 21 jours en ajoutant du Cd (1, 3, 5, 10 et 15 mM) dans la cuvette lors de la mesure d'activité de la phosphatase alcaline.

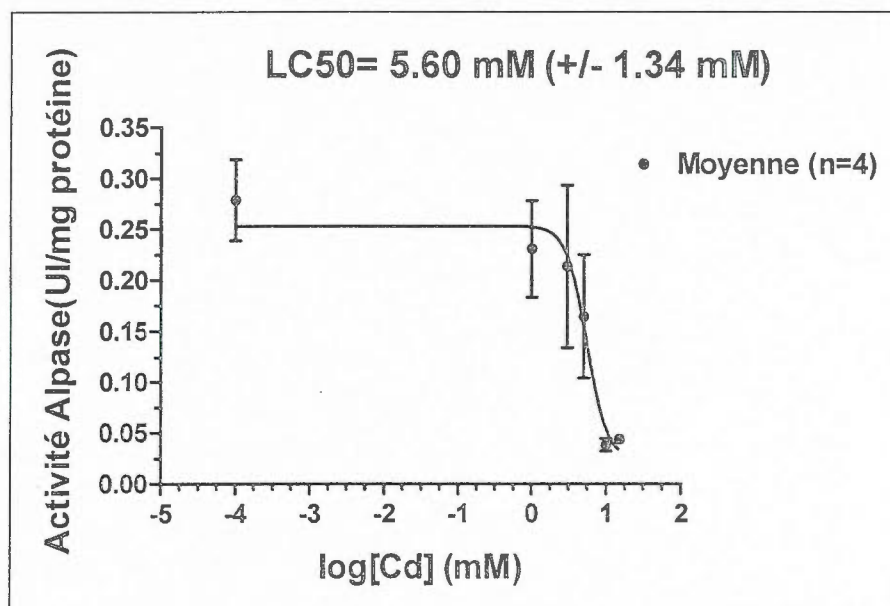


Figure 7. 16 Activité de la phosphatase alcaline en fonction de concentrations croissantes de Cd ajoutées en cuvette lors du dosage d'échantillons cellulaires contrôles de 21 jours de culture. Les résultats sont les moyennes \pm écarts types de 4 cultures indépendantes.

La courbe concentration-réponse obtenue (Figure 7. 16) montre une inhibition croissante d'activité de l'enzyme avec les concentrations croissantes de Cd ajoutées et que 5.6 mM de Cd suffit à inhiber de moitié son activité (LC50). Or, la figure 7.15 montre une inhibition significative de 75% dans les cellules cultivées en présence de 36 μ M de Cd du J8 au J21 ayant donc accumulées de 1 à 1,5 mM de Cd (Figure 7.8). On remarque que pour obtenir une telle inhibition de 75% lorsqu'on rajoute du Cd dans la cuvette lors du dosage, il faut additionner environ 9 mM, soit environ 9 fois plus que la concentration intracellulaire de Cd sur 2 semaines de traitement. Ceci démontre bien que l'on ne peut pas attribuer l'effet inhibiteur du Cd dans les cellules traitées au simple fait qu'il se lierait directement aux thiols fonctionnels de l'enzyme. L'effet inhibiteur du Cd est supérieur dans les cellules traitées qu'ajouté en cuvette. Ainsi, en plus de se fixer directement à l'enzyme et perturber son activité, le Cd aurait peut-être aussi une action au niveau de son expression. Pour vérifier cela, il aurait été intéressant d'étudier l'impact du Cd sur le niveau d'expression d'ARNm de la phosphatase alcaline, mais le temps nous a manqué. Le Cd aurait alors un double effet simultané responsable de cette chute d'activité de l'enzyme.

7.8 Effet du Cd sur l'étanchéité de la monocouche cellulaire

La mesure de la résistance électrique transépithéliale (RETE) reflète la perméabilité de l'épithélium. La figure 7.17 montre que la RETE entre le compartiment apical et le compartiment basal augmente pendant les 15 premiers jours de culture dans les cellules contrôles jusqu'à $110 \Omega \cdot \text{cm}^2$, puis se maintient jusqu'au 21^{ème} jour de culture. En effet, après environ deux semaines de culture, les cellules sont bien différenciées, les jonctions serrées au pôle apical sont mises en place. Tandis que nous observons à partir du 8^{ème} jour de culture, début du traitement des cellules au Cd, une diminution de cette valeur qui chute brusquement jusqu'à devenir nulle au 21^{ème} jour. Ceci caractérise une augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire par rapport aux cellules contrôles.

En effet, des études ont montré qu'en plus d'altérer la viabilité cellulaire (section 7.1) le Cd pouvait affecter l'intégrité de l'épithélium intestinal notamment en augmentant la perméabilité paracellulaire (Duizer et al., 1999; Boveri et al., 2004; Berzina et al., 2007). Le Cd peut sans doute perturber l'expression de protéines de jonctions intercellulaires. Dans notre étude, la concentration de Cd responsable de cette augmentation de perméabilité paracellulaire ne provoque que 5% de mortalité. Cependant, une perte de 5% de cellules sur la monocouche peut suffire à faire chuter la RETE, qui n'est donc pas nécessairement attribuable à une modification d'expression des jonctions serrées par les cellules viables dans nos conditions expérimentales.

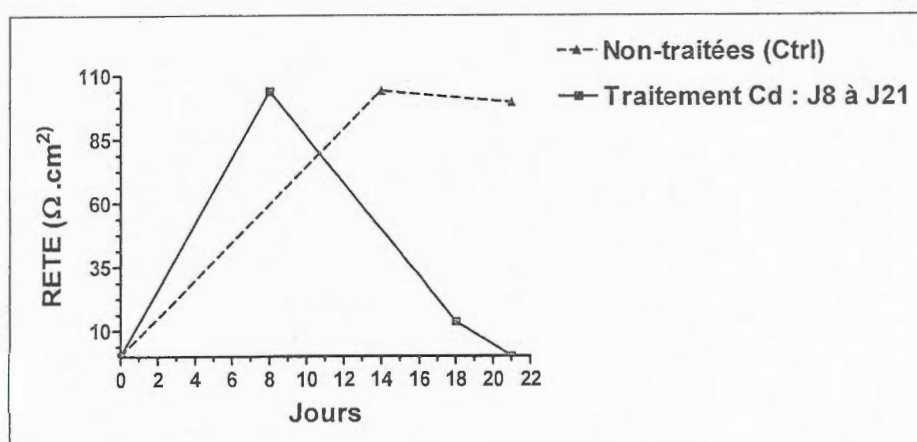


Figure 7.17 Mesure de la résistance électrique transépithéliale (RETE) du tapis de cellules Caco-2 selon le temps de culture ($n = 1$). Les cellules ont été cultivées pendant 21 jours sur filtres de 24 mm de diamètre ayant des pores de $0,4 \mu\text{m}$ en présence ou en absence (contrôles) de Cd.

CONCLUSION

La population en générale est exposée au Cd, un métal lourd très toxique même à faibles concentrations, principalement par l'ingestion d'aliments contaminés et le risque d'être victime d'une intoxication chronique est élevé en raison de la longue demi-vie de ce métal dans le corps humain. Une fois absorbé, le Cd ingéré est fortement accumulé dans l'épithélium intestinal faisant de lui un organe cible. A l'aide du modèle Caco-2, lignée cellulaire humaine développant spontanément un phénotype entérocytaire une fois la confluence atteinte, nous avons cherché à estimer dans quelle mesure une exposition chronique au Cd pouvait perturber l'expression des enzymes de biotransformation lors de la différenciation des entérocytes.

Suite à notre étude, nous avons pu constater que le Cd affecte spécifiquement l'expression d'enzymes de biotransformation. En effet, nous avons observé que le Cd induit de plus hauts niveaux d'ARNm de GSTP1 et de P-gp mais que cette induction est diminuée en présence de vitamine D₃. Comme nous avons mesuré une accumulation cellulaire de 4 à 5 nmol de ¹⁰⁹Cd/mg de protéines cellulaires quelques soient les conditions d'exposition au Cd (Cd, Cd + Vit D₃, NAC + Vit D₃), que la NAC et la vitamine D₃, toutes deux anti-oxydantes, préviennent l'induction de la P-gp et de la GSTP1 par le Cd, nous suggérons que l'effet du Cd sur la GSTP1 et la P-gp est médié par un déséquilibre rédox. Afin de savoir si l'effet du Cd sur les niveaux d'ARNm se traduisait aussi au niveau fonctionnel, des mesures d'activités enzymatiques de CYP1A1 et de GSTP1 ont été effectuées. Bien que plusieurs études aient démontré l'effet inhibiteur du Cd sur l'activité EROD, nous avons mesuré une activité extrêmement faible d'environ 0,290 pmol/min/mg de protéines microsomaux sensiblement la même dans les cellules contrôles et traitées au Cd de 21 jours, probablement due à un problème lors de la purification des microsomes. Par ailleurs, concernant l'effet du Cd sur l'activité de la GST, nous avons mis en évidence deux types de réponse pouvant notamment s'expliquer par l'hétérogénéité de la lignée cellulaire Caco-2: (1) une légère stimulation tout comme le montrent Tjalkens et al. (1998 a), (2) une faible inhibition pouvant s'expliquer par la liaison du Cd à des groupements thiols fonctionnels de la GST, indépendamment du fait que le Cd peut aussi diminuer la vitesse de la réaction en se liant au cofacteur GSH.

Les enzymes de biotransformation n'étant pas toutes affectées de la même façon, l'effet du Cd sur celles-ci n'est pas le résultat (indirect) d'une action non spécifique sur le processus global de différenciation. Nous avons observé une inhibition significative de 75% de l'activité de la phosphatase alcaline, marqueur spécifique de différenciation des cellules Caco-2, dans les échantillons traités pendant deux semaines au Cd avec ou sans vitamine D₃. Aussi, nous avons constaté qu'une partie de l'inhibition de la phosphatase peut être attribuable à la fixation directe du Cd sur l'enzyme. Pour vérifier si le Cd a peut-être aussi une action au niveau de l'expression de l'enzyme, il aurait été intéressant d'étudier les niveaux d'ARNm de la phosphatase alcaline. Le Cd aurait alors un double effet simultané responsable de cette chute d'activité de l'enzyme.

En plus d'altérer la viabilité cellulaire, nous avons également observé une diminution de la résistance électrique transépithéliale ce qui confirme que le Cd affecte aussi l'intégrité de l'épithélium intestinal en augmentant la perméabilité paracellulaire (Duizer et al., 1999; Boveri et al., 2004; Berzina et al., 2007).

Ce projet suggère qu'une exposition chronique au Cd via l'alimentation peut affecter l'épithélium intestinal et notamment perturber sa fonction de biotransformation qui représente un mécanisme important de « détoxication » pour l'organisme. Cependant il est important de rappeler la prudence à adopter lors de l'extrapolation *in vitro-in vivo* car on peut se demander si les perturbations engendrées par le Cd que nous avons pu observer sont elles également observables *in vivo*. La biodisponibilité des composés administrés oralement dépend de plusieurs facteurs dont les propriétés physico-chimiques qui prédisposent ou non la molécule à subir des transformations métaboliques. Ainsi cette étude fournit des données supplémentaires pour une meilleure évaluation du risque relatif à l'impact du Cd sur la toxicocinétique, et suggère des répercussions sur le métabolisme de premier passage des médicaments et autres xénobiotiques absorbés oralement. Mais ce champ de recherche reste vaste et complexe et mérite d'être investigué davantage, comme par exemple l'impact du Cd sur d'autres enzymes de biotransformation de l'intestin, ou sur certaines voies de signalisation cellulaires clés pour les fonctions intestinales.

RÉFÉRENCES

- Aiba T, Susa M, Fukumori S et Hashimoto Y. 2005. The effects of culture conditions on CYP3A4 and MDR1 mRNA induction by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 in human intestinal cell lines, Caco-2 and LS180. *Drug. Metab. Pharmacokinet*, 20 (4), p 268-274.
- Anderle P, Niederer E, Rubas W, Hilgendorf C, Sphan-Langguth H, Wunderli-Allenspach H, Merkle HP ET Langguth P. 1998. P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cells monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. *J. Pharm. Sci.* 87, p 757-762.
- Arrigo AP. 1999. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med.* 27, p 936-44.
- Artursson P. 1990. Epithelial transport of drugs in cell culture. A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive Caco-2 cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79, p 476-482.
- ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1999. Toxicological profil for cadmium, US. Department of Health and Human Services, Public Health Services, 397 p.
- Bagchi D, Joshi SS, Bagchi M, Balmoori J, Benner EJ, Kuszynsk, CA, Stohs SJJ. 2000. Cadmium- and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemic K562 cells, promyelocytic leukemic HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Mol. Toxicol.* 14, p 33- 41.
- Bao BY, Ting HJ, Hsu JW et Lee YF. 2008. Protective role of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int. J. Cancer* 122, p 2699-2706.
- Beaumont PO, Moore MJ, Ahmad K, Payne MM, Lee C et Riddick DS. 1998. Role of Glutathione S-Transferases in the Resistance of Human Colon Cancer Cell Lines to Doxorubicin. *Cancer Research* 58, p 947-955.
- Bergelson S, Pinkus R et Daniel V. 1994. Intracellular glutathione levels regulated Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer Res* 54, p 36-40.
- Bergeron PM et Jumarie C. 2006. Characterization of cadmium uptake in human intestinal crypt cells HIEC in relation to inorganic metal speciation. *Toxicology* 219, p 156-166.
- Bernard A., Roels H, Buchet JP., Cardenas A., Lauwerys R. 1992. Cadmium and Health: the Belgian experience. *IARC Scientific Publications* 118, p 15-33.
- Bertrand- Thiebault C. 2004. Sujet de Thèse : Cytochromes P450 et Tonus Vasculaire. Université Henri Poincare, Nancy I.

- Berzina N, Markovs J, Isajevs S, Apsite M, Smimova G. 2007. Cadmium-induced enteropathy in domestic cocks: A biochemical and histological study after subchronic exposure. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101, p 29–34.
- Bewers JM., Barry PJ, MacGregor DJ. 1987. Distribution and Cycling of Cadmium in the Environment, Cadmium in the Aquatic Environment, JO. Nriagu et JB Sprague (éd.), John Wiley and Sons, Toronto (Ont.), p 1-18.
- Bienz M et Pelham HRB. 1987. Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Adv.Genet.* 24, p 31-72.
- Blais A, Bissonnette P et Berteloot A.1987. Common characteristics for NA^+ -dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. *Journal of Membrane Biology*, 99, p 113-125.
- Blume HP., Brummer G. 1991. "Prediction of Heavy Metal Behavior in Soil by Means of Simple Field Tests", *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22, p 164-174
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the regulation of gene expression; *Trends. Cell.Biol.* 11, p 66-75.
- Borlack J, Zwaldo C. 2003. Expression of drug-metabolizing enzymes, nuclear transcription factors and ABC transporters in Caco-2 cells. *Xenobiotica* 3, p 927-943.
- Boulenc X, M Bourrie, I Fabre, C Roque, H Joyeux, Y Berger et G. Fabre. 1992. Regulation of cytochrome P450IA1 gene expression in a human intestinal cell line Caco-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, p. 1471–1478. View Record in Scopus Cited By in Scopus (56).
- Bourdin JB. 2009. Mise au point d'une méthode de phytoremédiation pour les rizières polluées au Cadmium. BE Japon 512 (04/09/2009). Ambassade de France au Japon/ADIT.
- Boveri M, Pazos P, Gennari A, Casado J, Hartung T, Prieto P. 2004. Comparison of the sensitivity of different toxicological endpoints in Caco-2 cells after cadmium chloride treatment. *Arch Toxicol* 78, p 201–206.
- Boyland E et Chasseaud LF. 1969. The Role of Glutathione and Glutathione S Transferase in Mercaptic Acid Biosynthesis. *Adv. Enzymol* 32, p 173 – 219.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72, p 248-256.
- Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. 2001. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Volume 2, 15th Edition. McGraw-Hill.
- Brignon JM, Malherbe L. Cadmium et ses dérivés. Rapport INERIS-DRC-MECO. 2005.

Buchet JP, Lauwerys R, Roels H.1990. Renals effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet* 336, p 699-702.

Buesen R, Mock M, Seidel A, Jacob J et Lampen A. 2002. Interaction between metabolism and transport of benzo- α -pyrene and its metabolites in entérocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*183.

Buesen R, Mock M, Nau H, Seidel A et Jacob J et Lampen A. 2003. Human intestinal Caco-2 cells display active transport of benzo- α -pyrene metabolites. *Chem.Biol. Interact.* 142, p 201-221.

Burdon RH. 1986. Heat shock and the heat shock proteins. *Biochem.J.*240, p 313-324.

Burke MD et Mayer R.T. 1974. Ethoxyresorufin : direct fluorimetric assay of microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug. Metab. Disp* 2, p 583-588.

Burton PS, Goodwin TJ, Conradi RA, Ho NFH et Hilgers AR. 1997. In vitro permeability of peptidomimetic drugs : the role of polarized efflux pathways as additional barriers to absorption. *Adv, Drug. Deliv. Rev.* 23, p 143-156.

Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P et Gros P. 1999. Cellular and Subcellular Localization of the Nramp2 Iron Transporter in the Intestinal Brush Border and Regulation by Dietary Iron. *Blood*, Vol 93, No 12, p 4406-4417.

Cardin GB, Mantha M et Jumarie C. 2009. Resistance to cadmium as a function of Caco-2 cell differentiation: role of reactive oxygen species in cadmium-but not zinc-induced adaptation mechanisms. *Biometals* 22, p 753-769.

Carrière P. 2008. Titre du mémoire : Caractérisation du transport transépithélial de cadmium dans des cellules intestinales humaines TC7 cultivées sur filtres.

Carrière P, Mantha M, Champagne-Paradis S, Jumarie C. 2001. Characterization of basolateral-to-apical transepithelial transport of cadmium in intestinal TC7 cell monolayers.

Carriere V, Barba, A, Rousse, M, Brot-Laroche E, Dussaulx E, Cambier D, De Waziers ID, Beaune P et Zweibaum A. 1996. Regulation of sucrase-isomaltase and hexose transporters in Caco-2 cells: a role for cytochrome P-4501A1? *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*, Vol 270, Issue 6, p G976-G986.

Carrière V, Rodolosse A, Lacasa M, Cambier D, Zweibaum A, Rousset M. 1998. Hypoxia and CYP1A1 induction-dependent regulation of proteins involved in glucose utilization in Caco-2 cells. *Am J Physiol.* 274 (6 Pt 1):G1101-8.

Carrière V, Chambaz J et Rousset M. 2001. Intestinal responses to xenobiotics. Session 4: Xenobiotics and Gene Expression. *Toxicology in Vitro* p 373-378.

Catala M, André JM, Katsanis G et Poirier J. (2007–2008). Cours d'histologie PCEM2 - DCEM1 2007 – 2008. Faculté de médecine Pierre et Marie Curie.

Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique (CBIP). Août 1999. Variabilité dans le métabolisme de médicament due au cytochrome P450. *Folia Pharmacotherapeutica*.

Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG et Zweibaum A. 1988. Epithelial polarity, villin expression and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: A survey of twenty cells lines. *Cancer Research*, 48, p 1936-1942.

Chasseaud, LF. 1976. Conjugation with glutathione and mercaptic acid excretion. In: *Gluthation: Metabolism and Function*. Editions Arias IM et Jakoby WB. Raven Press, New York, p 77-114.

Chatterjee S, Bhattacharya S. 1984. Detoxication of industrial pollutants by the glutathione S-transferase system in the liver of *Anabas testudineus* (bloch). *Toxicol. Lett.*, 22, p 87-198.

Chin KVC, Tanaka S, Darlington G, Pastan I et Gottesman MM. 1990. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J. Biological. Chemistry*. 265 (1), p 221-226.

Chun YJ, Kim S, Kim D, Lee SK et Guengerich FP. 2001. A New Selective and Potent Inhibitor of Human Cytochrome P450 1B1 and Its Application to Antimutagenesis. *Cancer Research* 61, Issue: 22, p 8164-8170.

Claverie I, Hedde H. *Cahier du préparateur en pharmacie : Pharmacologie générale - Toxicologie: Mécanismes fondamentaux. Partie 1*, p.19, 2^{ème} édition (2008). Collection Porphyre.

Commandeur JN, Stijntje, GJ et Vermeulen NP. 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol Rev*, 47 (2), p 271-330.

Cornaire G, Woodley JF et Houin G. 2002. Influence des transporteurs d'efflux sur le passage intestinal des médicaments. *Revue Française des Laboratoires*. 339.

Cotton FA et Wilkinson G. 1972. Zinc, cadmium and mercury. *Advanced inorganic chemistry*. 3^{ème} édition. Interscience Publishers p. 503.

Del Moral RG, Olmo A et Aguilar M. 1998. P-glycoprotein: a new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity. *Exp. Nephrol* 6 (2), p 89-97.

Duizer E, Gilde AJ, Versantvoort CH, Groten JP. 1999. Effects of cadmium chloride on the paracellular barrier function of intestinal epithelial cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol* 155, p 117-126.

Eastwood GL. 1977. Gastrointestinal epithelial renewal. *Gastroenterology*, 72, p 962-975.

Eichholz A. 1967. Structural and functional organization of the brush border of intestinal epithelial cells. III. Enzymic activities and chemical composition of various fractions of Tris-disrupted brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 135, p 475-482.

Elbekai RH, Korashy HM, Wills K, Gharavi N and El-Kadi AOS. 2004. Benzo[a]Pyrene, 3 Methylcholanthrene and b-Naphthoflavone Induce Oxidative Stress in Hepatoma Hepa 1c1c7 Cells by an AHR-dependent Pathway. *Free Radical Research*, Volume 38, Number 11, p1191-1200.

Elbekai RH et El-Kadi AOS. 2004. Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated gene expression by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology* 202, p 249-269.

Elbekai RH et El-Kadi AOS. 2005. The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As³⁺, Cd²⁺, and Cr⁶⁺. *Free Radical Biology & Medicine* 39, p 1499-1511.

Elbekai RH et El-Kadi AOS. 2007. Transcriptional activation and posttranscriptional modification of Cyp1a1 by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology Letters* 172, p 106-119.

Elisma F et Jumarie C. 2001. Evidence for Cadmium Uptake through NRAMP2: Metal Speciation Studies with Caco-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285, p 662-668.

Engman HA, Lennernäs H, Taipalensuu J, Otter C, Leidvik B et Artursson P. 2001. CYP3A4, CYP3A5, and MDR1 in human small and large intestinal cell lines suitable for drug transport studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 90, Issue 11, p 1736 – 1751.

Environnement Canada. National inventory of sources and emissions of cadmium (1976). Rapport APCD 76-2, Direction générale de lutte contre la pollution de l'air, Ottawa.

Eriksson JE. 1989. The Influence of pH, Soil Type and Time on Adsorption and Uptake by Plants of Cadmium Added to the Soil. *Water Air Soil Pollut.* 48, p 317-336.

European Food Safety Authority (EFSA). 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 724, 1-114.

Fan J, Liu S, Du Y, Morrison J, Shipman R et Pang KS. 2009. Up-regulation of transporters and enzymes by the vitamin D receptor ligands, 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ and vitamin D analogs, in the Caco-2 cell monolayer. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330 (2), p 389-402.

Flanagan PR, McLellan JS, Haist J, Cherian G, Chamberlain MJ et Valberg LS. 1978. Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology* 74, p 841-846.

Fogh J, Fogh JM et Orfeo T. 1977. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Canc. Inst.* 59, p 221-226.

Fontana RJ, Lown KS, Paine MF, Santella RM, Felton JS, Knize MG, Greenberg A et Watkins PB. 1999. Effects of a char-grilled meat diet on expression of CYP3A4, CYP1A1 and P-glycoprotein levels in healthy volunteers. *Gastroenterology* 117, p 89-98.

Forest M. 2003. Cours cegep St-Jérôme 101-902 : Le corps humain 1 (101-108-JR), cours 40, Chapitre : Le système digestif. <http://cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-902-m.f/bio902/Materielpedagogiqueutilise/Cours%20version%20PDF/cours40.pdf>

Friberg L, Piscator M, Nordberg GF et Kjellstrom T. 1974. Cadmium in the environment. 2^{ème} édition. CRC Press, Cleveland, OH.

Friberg L, Elinder CG, Kjells T et Nordberg GF. 1985. Cadmium and Health: A toxicological and epidemiological appraisal. Vol.1. Boca Raton, FL: CRC Press.

Furst A, Mogannam JD. 1975. Inhibition of aryl hydrocarbon hydroxylase by cadmium ion. *Proc West Pharmacol Soc* 18, p 326-329.

Gan LSL, Moseley MA, Koshla B, Augustijns PF, Bradshaw TP, Hendren RW et Thakker DR. 1996. CYP3A4-like cytochrome P450-mediated metabolism and polarized efflux of cyclosporine A in Caco-2 cells: Interaction between the two biochemical barriers to intestinal transport. *Drug Metab Dispos* 24, p 344-349.

Garcion E, Sindji L, Leblondel G, Brachet P, Darcy F. 1999. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of γ - glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J. Neurochem.* 73, p 859-866.

Garland CF, Garland FC. 1980. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol* 9, p 227-31.

George SG, Young P. 1986. The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Comp Biochem Physiol C* 83, p 37-44.

Goodwin B, Redinbo MR, Kliewer SA. 2002. Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, p 1-23.

Goto M, Masuda S, Saito H et al. 2002. C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 12, p 451.

Goto M, Masuda S, Saito H et Inui K. 2003. Decreased expression of P-glycoprotein during differentiation in the human intestinal cell line Caco-2. *Biochemical Pharmacology* 66, p 163-170.

Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A et Desjeux JF. 1984. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2 : electrical parameters. *Am. J. Physiol* 16, p C260-C267.

Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JMA, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P et Souidi M. 2006. Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Ann Biol Clin* 64, 6, p 535-48.

Guengerich FP. 1999. Cytochrome P-450 3A4 : regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, p 1-17.

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Golla, JL et Hediger MA. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, p 482-488.

Habig WH, Pabst ML et Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases : the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J.Biol.Chem* 249, p 7130-7139.

Hanchette CL, Schwartz GG. 1992. Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation. *Cancer* 70, p 2861-9.

Haritash AK et Kaushik CP. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169, p 1-15.

Hayes JD et Pulford DL. 1995. The glutathione S-transferase super- gene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, p 445-600.

Hayes JD et McLellan LI. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 31, p 273-300.

Hebert M, Roberts J, Prueksaritanont T et Benet L. 1992. Bioavailability of cyclosporine with concomitant rifampin administration is markedly less than predicted by hepatic enzyme induction. *Clin. Pharmacol. Ther.* 52, p. 453-457.

Hidalgo IJ, Raub TJ et Borchardt RT. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96, p 736-749.

Hidalgo IJ et Li J. 1997. Carrier-mediated transport and efflux mechanism in Caco-2 cells. *Adv. Drug. Deliv. Rev* 22, p 53-66.

Hillgren KM, Kato A et Borchardt RT. 1995. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Medicinal Research Reviews* 15, p 83-109.

Hochman JM, Chiba M, Yamazaki M, Tang C et Jiunn H. Lin. 2001. P-glycoprotein-Mediated Efflux of Indinavir Metabolites in Caco-2 Cells Expressing Cytochrome P450 3A4. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298, p 323-330.

Hou XL, Takahashi K, Kinoshita N, Qiu F, Tanaka K, Komatsu K, Takahashi K et Azuma J. 2007. Possible inhibitory mechanism of Curcuma drugs on CYP3A4 in 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 treated Caco-2 cells. *International Journal of Pharmaceutics* 337, p 169-177.

Hussain T, Shukla GS et Chandra SV. 1987. Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: in vivo and in vitro studies. *Pharmacol. Toxicol.* 60 (5), p 355-358.

Huynh-Delerme, C, Huet H, Noël L, Frigieri A et Kolf-Clauw M. 2005. Increased functional expression of P-glycoprotein in Caco-2 TC7 cells exposed long-term to cadmium. *Toxicology in Vitro*, Volume 19, Issue 4, p 439-447.

IARC: International Agency for Research on Cancer (1983) Benzo[a]pyrene, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, vol. 32, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, p. 211-224.

Ishikawa T, Bao JJ, Yamane Y, Akimaru K, Frindrich K, Wright CD et Tien Kuo M. 1996. Coordinated induction of MRP/GS-X Pump and γ -Glutamylcysteine Synthetase by heavy metals in human Leukemia cells. *J. Biological Chemistry* 274(25), p 14981-14988.

Jacob J, Grimmer G. 1996. Metabolism and excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat and in human. *Cent.Eur.J. Public Health* 4, p 33-39.

Janardan SK, Lown KS, Ghosh M, Kolars JC et Watkins PB. 1994. CYP3A5 expression in human enterocytes. *Gastroenterology* 106, A241 (abstr.).

Järup L. 2002. Cadmium overload toxicity. *Nephro Dial Transplant* 17, p 35-39.

Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G, Clarke R, Sholler PF, Lirio AA, Foss C, Reiter R, Trock B, Paik S et Martin M. 2003. "Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland". *Nature Medicine* 9 (8), p 1081-1084.

Jumarie C et Malo C. 1991. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, vol. 149, n°1, p 24-33.

Jumarie C, Campbell PGC, Houde M et Denizeau F. 1999. Evidence for an Intracellular Barrier to Cadmium Transport Through Caco-2 Cell Monolayers. *J. Cell. Physiol.* 180, p 285-297.

Jumarie C, Fortin C, Houde M, Campbell PGC et Denizeau F. 2001. Cadmium uptake by Caco-2 cells: effects of complexation by chloride, glutathione and phytochelatins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170, p29-38.

Kasprzak KS. 1995. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Invest.* 13, p 411-30.

Katoh M, Nakajima M, Yamazaki H et Yokoi T. 2001. Inhibitory effects of CYP3A4 substrates and their metabolites on P-glycoprotein-mediated transport. *Eur. J. Pharm. Sci* 12 (4), p 505-513.

Kitamura M, Sumiro K, Kamatanni N. 1970. Cadmium concentrations in livers, kidneys and bones of human bodies. *Jpn. J. Public. Health.* 17: S07.

Kliewer SA, Goodwin B, and Willson TM. 2002. The nuclear pregnane X receptor : a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 23, p 687-702.

Kolars JC, Lown KS, Schmiedln-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, Merion RM et Watkins PB. 1994. CYP3A4 gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 4, p 247-259.

Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D. 2003. The role of vitamin D in prostate cancer. *Recent Results Cancer Res* 164, p 205-21.

Lampen A, Ebert B, Stumkat L, Jacob J et Seidel A. 2004. Induction of gene expression of xenobiotic metabolism enzymes and ABC-transport proteins by PAH and a reconstituted PAH mixture in human Caco-2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1681, p 38-46.

Lin R, Nagai Y, Sladek R, Bastien Y, Ho J, Petrecca K, Sotiropoulou G, Diamandis EP, Hudson TJ, White JH. 2002. Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitamin D₃ analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. *Mol Endocrinol* 16, p 1243-56.

Lorrot M, Monique Vasseur M et Bourrillon A. 2006. Physiopathologie de la diarrhée à rotavirus. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie* 9 (1), p 10-6.

Lymburner DB. 1974. Environmental contaminants inventory study No. 2. Report Series No. 39, Centre canadien des eaux intérieures, Direction des eaux intérieures, Ottawa.

Ma X, Idle JR, and Gonzalez FJ. 2008. The pregnane X receptor: from bench to bedside. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4, p 895-908.

Mahraoui L, Rousset M, Dussaulx E, Darmoul D, Zweibaum A et Brot-Laroche. 1992. Expression and localization of GLT-5 in Caco-2 cells, human small intestine and colon. *American Journal of Physiology*, 263, p G312-318.

Mahraoui L, Takeda J, Mesonero J, Chantret I, Dussaulx E, Bell GI et Brot-Laroche E. 1994. Regulation of expression of the human fructose transporter (GLUT5) by cyclic AMP. *Biochemical Journal* 301, p 169-175.

Maier A, Dalton TP, and Puga A. 2000. Disruption of Dioxin-Inducible Phase I and Phase II Gene Expression Patterns by Cadmium, Chromium, and Arsenic. *Molecular carcinogenesis* 28, p 225-235.

Mantha M et Jumarie C. 2010. Cadmium-induced hermetic effectin differentiated Caco-2 cells: ERK and p38 activation without cell proliferation stimulation. *Journal of Cellular Physiology* 9999, p 1-12.

Marieb EN. 1993. Anatomie et Physiologie Humaine. Chapitre 24. Edition ERPI.

- Marieb EN. 2005. Anatomie et Physiologie Humaine. Chapitre 24 (6^{ème} éd. ERPI).
- Mannervik B. 1985. The isozymes of Glutathione Transferase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 57, p 357-417.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T et al. 2004. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein) : Recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 75, p 13-33.
- Maurel P. 1996. The CYP3A family. In: Ioannides C, editor. *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological aspects*. Boca Raton: CRC Press, Inc, p 241-270
- Misra UK, Gawd, G, Akabanni G et Pizzo AV. 2002. Cadmium-induced DNA synthesis and cell proliferation in macrophages: The role of intracellular cadmium and signal transduction mechanisms. *Cell Signal* 14, p 327-340.
- Morel Y et Barouki R. 1998. "Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1". *J. Biol. Chem.* 273, p 26969-26976.
- Morel Y et Barouki R. 1999. "Repression of geneexpression by oxidative stress". *Biochem. J.* 342, p 481-496.
- Muller J, Sidler D, Nachbur U, Wastling J, Brunner T et Hemphill A. 2008. Thiazolides inhibit growth and induce glutathione-S-transferase Pi (GSTP1)-dependent cell death in human colon cancer cells. *Int. J. Cancer*: 123, p 1797-1806.
- Nebert DW, Duffy JJ. 1997. How knockout mouse lines will be used to study the role of drug-metabolizing enzymes and their receptors during reproduction and development, and in environmental toxicity, cancer, and oxidative stress. *Biochem. Pharmacol* 53, p 249-254.
- Nieboer E, Fletcher GG. 1996. Determinants of reactivity in metal toxicology. Chang LW, editor. *Toxicology of metals*. Boca Raton: CRC Press; p 113-132.
- Nordberg GF, Piscator M et Nordberg M. 1971. On the distribution of cadmium in blood. *Acta Pharmacol. Toxicol*, 30 (3), p 289-95.
- Nordberg GF, Nogawa, K, Nordberg M, Friberg LT. 2007. Cadmium, In: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L. (Eds.), *Handbook of Toxicology of Metals*, 3^{ème} édition. Elsevier Publishers, Amsterdam, chapitre 23, p 445-480.
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee. 1999. *Cell* 97, p 161-163.
- Ohta H et Cherian MG. 1991. Gastrointestinal absorption of cadmium and metallothionein. *Toxicology* 107, p 63-72.
- Ohta H et Cherian MG. 1995. The influence of nutritional deficiencies on gastrointestinal uptake of cadmium and cadmium-metallothionein in rats. *Toxicology*. 97, p 71-80.

Paine MF, Khalighi M, Fischer JM, Shen DD, Kunz, KL, Perkins JD, Marsh CL et Thummel KE. 1997. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A- dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 283, p 1552-1562.

Paine M, Hart H, Ludington S, Haining R, Rettie A et Zeldin D. 2006. The human intestinal cytochrome P450 « Pie ». *Drug Metab. Dispos.* 34, p 880-886.

Park JY, Shigenaga MK et Ames .N. 1996. "Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop- dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage", *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, p 2322-2327.

Park JD, Cherrington NJ et Klaassen CD. 2002. Biotransformation and Toxicokinetics: Intestinal Absorption of Cadmium is associated with Divalent Metal Transporter 1 in Rats. *Toxicological Sciences* 68, p 288-294.

Peehl DM, Shinghal R, Nonn L, Seto E, Krishnan AV, Brooks JD, Feldman D. 2004. Molecular activity of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary cultures of human prostatic epithelial cells revealed by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92, p 131-41.

Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. 1998. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 28, p 1203-53.

Pernice R, Hauder J, Koehler P, Vitaglione P, Fogliano V et Veronika Somoza V. 2009. Effect of sulforaphane on glutathione-adduct formation and on glutathione_S_transferase-dependent detoxification of acrylamide in Caco-2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, p 1540-1550.

Peters WHN et Roelofs HMJ. 1989. Time-dependent activity and expression of glutathione S-transferases in the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Biochem J* 264, p 613-616.

Pinto M, Appay MD, Simmon-Assmann P, Chevalier G, Dracopoli N, Fogh J et Zweibaum A. 1982. Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biology of the Cell*, 44, p 193-196.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simmon-Assmann P, Haffen K, Fogh J et Zweibaum A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47, p 323-330.

Piscator M et Lind B. 1972. Cadmium, zinc, copper and lead in human renal cortex. *Arch. Environ. Health* 24, p 426.

Pizzol J. Titre du mémoire : Etude des impacts moléculaires des inducteurs du CYP3A sur la régulation des processus apoptotiques au niveau hépatique chez le rat. 2003. Ministère de l'Education Nationale, Ecole Pratique des Hautes Etudes, Sciences de la Vie et de la Terre.

Podrebarac DS. 1984. Pesticide, metal, and other chemical residues in adult diet total samples (XIV). (October 1977 - September 1978). *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67, p 176.

Poland A et Knutson J.C. 1982. "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, p 517-554.

Pohl C, Will F, Dietrich H et Schrenk D. 2006. Cytochrome P450 1A1 expression and activity in Caco-2 cells: modulation by apple juice extract and certain apple polyphenols. *J Agric Food Chem.* 27, 54(26), p 10262-8.

Rahman I, Smith CA, Lawson MF, Harrison DJ et MacNee, W. 1996. Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 396, p 21-5.

Rahman Q, Abidi P, Afaq F, et al. 1999. Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit Rev Toxicol.* 29, p 543-68.

Rahola T, Aaran R, Miettinen I. 1971. Half-time studies on mercury and cadmium by wholebody counting. In *Assessment of Radioactive Contamination in Man. Inter. Atom. Ener. Agen.* 13, p 553-562.

Rapport ToxProbe Inc. for Toronto Public Health. 1994. Cadmium (Cd) and its compounds.

Rivera SP, Saarikoski ST et Hankinson O. 2002. Identification of a novel dioxin inducible cytochrome P450. *Mol. Pharmacol.* 61, p 255-259.

Rousset M, Laburthe M, Pinto M, Chevalier G, Rouyer-Fessard C, Dussaulx E, Trugnan G, Boige N, Brun JL et Zweibaum A. 1985. Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2 : Modulation by forskolin. *Journal of Cellular Physiology* 123, p 377-385.

Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. 1996. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague-Dawley rats. *Int J Vitam Nutr Res* 66, p 39-45.

Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A et Zucco F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology* 21, p 1-26.

Santé Canada. Rapport Santé de l'environnement et du milieu de travail : Le Cadmium. 1986. <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cadmium/index-fra.php>.

Savini F, Berardi S, Tatone D et Spoto G. 1995. Phosphodiesterase in human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Life Sciences* 56 (22), p 421-425.

Scharmach E, Hessel S, Niemannand B, Lampen A. 2009. Glutathione S-transferase expression and isoenzyme composition during cell differentiation of Caco-2 cells. *Toxicology*, Volume 265, Issue 3, p 122-126.

Schmiedlin-Ren P, Edwards D, Fitzsimmons M, Kan H, Lown K, Woster P, Rahman A, Thummel K, Fisher J, Hollenberg P et Watkins P. 1997a. Mechanisms of enhanced oral bioavailability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents. Decreased enterocyte CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins. *Drug Metab. Dispos.* 25, p 1228-1233.

Schmiedlin-Ren P, Thummel KE, Fischer JM, Paine MF, Lown KS et Watkins PB. 1997b. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1α , 25- (OH) $_2$ - D $_3$. *Mol Pharmacol* 51, p 741-754.

Schreiberl T, Köhlel C, Felicitas Buckler, Schmohl S, Braeuning A, Schmiechen A, Schwarz M et Münzel PA. 2006. Regulation of CYP1A1 gene expression by the antioxidant Tert-Butylhydroquinone. *Drug. Metab. Dispos.* 34 (7), p 1096-101.

Schrenk D. 1998. Impact of dioxin-type induction of drugmetabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1155-1162.

Schroeder H.A et Balassa JJ. 1961. Abnormal trace metals in man: cadmium. *J. Chronic Dis* 14, p 236-258.

Schuetz EG, Yasuda K, Arimori K and Schuetz JD. 1998. Human MDR1 and mouse mdr1a P-glycoprotein alter the cellular retention and disposition of erythromycin, but not of retinoic acid or benzo- α -pyrene. *Arch. Biochem. Biophys.* 350, p 340-347.

Schümann K, Friebel P, Schmolke G, et Elsenhans B. 1996. State of iron repletion and cadmium tissue accumulation as a function of growth in young rats after oral cadmium exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, p 483-487.

Seithel A, Karlsson J, Hilgendorf C, Bjorquist A et Ungell AL. 2006. Variability in mRNA expression of ABC- SLC- transporters in human intestinal cells: Comparison between human segments and Caco-2 cells. *European journal of pharmaceutical sciences* 28, p 291-299.

SEME : Surveillance Environnement Marin Estuarien. 2005. Perrin JC, Amiard JC, Aissa P. Université du Québec à Rimouski (UQAR).

Sergent T, Dupont I, Jassogne C, Ribonnet L, Van der Heiden E, Scippo ML, Muller M, McAlister D, Pussemier L, Larondelle Y, Schneider YJ. 2009a. CYP1A1 induction and CYP3A4 inhibition by the fungicide imazalil in the human intestinal Caco-2 cells— Comparison with other conazole pesticides. *Toxicology Letters* 184, p 159-168.

Sergent T, Dupont I, Van Der Heiden E, Scippo ML, Pussemier L, Larondelle Y et YL Schneider. 2009b. CYP1A1 and CYP3A4 modulation by dietary flavonoids in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicology Letters* 191, p216-222.

Shaikh ZA, Vu TT et Zaman K. 1999. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154 (3), p 256-263.

Sherlock JC. 1984. Cadmium in foods and the diet. *Experientia*, 40, p 152.

Shukla GS, Shukla RJ, Potts RJ, Osier BA, Hart BA et Chiu JF. 2000. Cadmium mediated oxidative stress in alveolar epithelial cells induces the expression of γ -glutamylcysteine synthetase catalytic subunit and glutathione S-transferase α and π isoforms: Potential role of activator protein-1. *Cell Biology and Toxicology* 16, p 347-362.

Smith MW. 1985. Expression of digestive and absorptive function in differentiating enterocytes. *Annu Rev Physiol* 47, p 247-260.

Smith AJ, Van Helvoort A, Van Meer G, Szabo K, Welker E, Szakacs G, Varadi A, Sarkadi B, Borst P. 2000. MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol. Chem.* 275, p 23530-9.

Sonoda J, Rosenfeld JM, Xu L, Evans RM, Xie W. 2003. A nuclear receptor-mediated xenobiotic response and its implication in drug metabolism and host protection. *Curr Drug Metab* 4, p 59-72.

Spink DC, Katz BH, Hussain MM, Spink BC, Wu SJ, Liu N, Pause R et Kaminsky LS. 2002. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in T-47D human breast cancer cells by benzo[α] pyrene is diminished by arsenite. *Drug. Metab. Dispos.* 30, p 262-269.

Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18, p 321-336.

Sun SY. 2010. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer Biol. Ther* 9, p 109-110.

Suzuki H et Sugiyama Y. 2000. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12, p 3-12.

Synold TW, Dussault I et Forman BM. 2001. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nature Medicine* 7 (5), p 584-590.

Tallkvist J, Bowlus CL et Lönnerdal B. 2000. Functional and molecular responses of human intestinal Caco-2 cells to iron treatment. *Am J Clin Nutr* 72, p 770-5.

Tallkvist J, Bowlus CL et Lönnerdal B. 2001. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicology Letters* vol.122, issue 2, p 171-177.

Terrier P, Townsend AJ, Coindre JM, Triche TJ et Cowan .H. 1990. An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. *Am J Pathol*, 137 (4), p 845-53.

Thelen K, Dressman JB. 2009. Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *J Pharm Pharmacol*. 61(5), p 541-58.

Thévenod F, Friedmann JM, Katsen AD et Hauser IA. 2000. Up-regulation of Multidrug Resistance P-glycoprotein via Nuclear Facteur κ B activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J. Biological Chemistry*. 275 (3), p 1887-1896.

Thévenod F. 2009. Cadmium and cellular signaling cascade: To be or not to be? *Toxicol Appl Pharmacol* 238, p 221-239.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottessman SS, Pastan I et Willingham ML. 1987. Cellular localization of the multi-drug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Nat. Acad. Sci, USA*, 84, p7735-7738.

Tian JQ et Quaroni A. 1999. Dissociation between growth arrest and differentiation in Caco-2 subclone expressing high levels of sucrase. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 276, p G1094-G1104.

Tjalkens RB, Luckey SW, Kroll D J et Petersen DR. 1998 (a). Alpha,beta-unsaturated aldehydes increase glutathione S-transferase mRNA and protein: correlation with activation of the antioxidant response element. *Arch.Biochem. Biophys*. 359 (1), p 42-50.

Tjalkens RB, Valerio LG, Awasthi YC et Petersen DR. 1998 (b). Association of glutathione S-transferase isozyme-specific induction and lipid peroxidation in two inbred strains of mice subjected to chronic dietary iron overload. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 151(1), p 174-181.

Université Médicale Virtuelle Francophone. Cours Université de médecine de Nantes. Item 242 : Hémochromatose. 2008-2009. <http://umvf.univ-nantes.fr/hepato-gastro-enterologie/enseignement/item242/site/html/cours.pdf>

US-EPA: United States Environmental Protection Agency. 1985. Evaluation and estimation of potential carcinogenic risks of polynuclear aromatic hydrocarbons: carcinogen assessment group. Office and Health and Environmental Assessment.

Vachon PH et Beaulieu JF. 1992. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103 (2), p 414-23.

Vecchini F, Pringault E, Billiar TR, Geller DA, Hausel H et Felley-Bosco E. 1997. Decreased Activity of Inducible Nitric Oxide Synthase Type 2 and Modulation of the Expression of Glutathione S-Transferase a, bcl-2, and Metallothioneins during the Differentiation of CaCo-2 Cells. *Cell Growth & Differentiation* 8, p 261-268.

Von Zglinicki T, Edwall C, Ostlund E, Lind B, Nordberg M, Ringertz NR et Wroblewski J. 1992. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. *J Cell Sci* 103, p1073-1081.

Wacher V, Salphati L et Benet L. 2001. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption, *Adv. Drug Del. Rev*. 46, p 89-102.

Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Molowa DT et Guzelian PS. 1987. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J. Clin. Invest.* 80, p 1029-1036.

Watkins PB. 1997. The Barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv. Drug. Rev.* 27, p 161-170.

Wild AC et Mulcahy RT. 2000. Regulation of g-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: Insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free Radic Res* 32, p 281-301.

Williams RT 1959. *Detoxication Mechanisms*, 2nd édition. London: Chapman & Hall.

Wiseman H, Smith C, Arnstein HRV, Halliwell B et Cannon M. 1991. The antioxidant action of ketoconazole and related azoles: comparison with tamoxifen and cholesterol. *Chem. Biol. Int.* 79 (2), p 229-243.

Wiseman H, Smith C, Halliwell B, Cannon M, Arnstein HRV et Lennard MS. 1992. Droloxifene (3-hydroxytamoxifen) has membrane antioxidant ability: potential relevance to its mechanism of therapeutic action in breast cancer. *Cancer Lett* 66 (1), p 61- 68.

Wiseman H. 1993. Vitamine D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *Federation of European Biochemical Societies* 326, 1,2,3, p 285-288.

Xu Y, Hashizume T, Shuhart MC, Davis CL, Nelson WL, Sakaki T, Kalhorn TF, Watkins PB, Schuetz EG et Thummel KE. 2005. Intestinal and hepatic CYP3A4 catalyze hydroxylation of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3): implications for drug-induced osteomalacia. *Mol. Pharmacol* 69 (1), p 56-65.

Xue W et Warshawsky D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206, p 73-93.

Yuen BB et Au DW. 2006. Temporal changes of ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) activities and lysosome accumulation in intestine of fish on chronic exposure to dietary benzo[α]pyrene: linking erod induction to cytological effects. *Environ Toxicol Chem.* 25(10), p 2593-600.

Zalups RK et Ahmad S. 2003. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicology and applied pharmacology* 186 (3), p 163-88.

Zieman C, Burkle A, Kahl GF et Hirsch-Ernst KI. 1999. Reactive oxygen species participate in mdrlb mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis*. 20 (3), p 407-414.

Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E et Louvard D. 1991. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. In : Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System. Intestinal Absorption and Secretion. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 1991, sect. 6, vol. IV, chapt. 7, p 223-255.

Zweibaum A. 1993. Différenciation des cellules cancéreuses coliques humaines : Une nouvelle approche du cancer du colon. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 177, p 63-71.